



HAL
open science

Etude des adaptations métaboliques tissulaires et systémiques dans les leucémies aigues myéloïdes

Guillaume Cognet

► **To cite this version:**

Guillaume Cognet. Etude des adaptations métaboliques tissulaires et systémiques dans les leucémies aigues myéloïdes. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30233 . tel-03684153

HAL Id: tel-03684153

<https://theses.hal.science/tel-03684153v1>

Submitted on 1 Jun 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Guillaume COGNET

Le 9 décembre 2021

**Etude des adaptations métaboliques tissulaires et systémique
dans les leucémies aiguës myéloïdes**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Jean-Emmanuel SARRY et Jean-Charles PORTAIS

Jury

Mme Sophie VASSEUR, Rapporteur

M. Marc BILLAUD, Rapporteur

M. Patrick EMOND, Rapporteur

M. Pierre SUJOBERT, Examineur

Mme Milica VUCETIC, Examinatrice

M. Jean-Emmanuel SARRY, Directeur de thèse

M. Jean-Charles PORTAIS, Co-directeur de thèse

Etude des adaptations métaboliques tissulaires et systémiques dans les leucémies aiguës myéloïdes

Par Guillaume Cognet

Directeurs de thèse

Jean-Emmanuel Sarry, Inserm

Jean-Charles Portais, Université Paul Sabatier

Résumés

RESUMES

Résumé

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont la classe d'hémopathies malignes la plus courante. Elles sont caractérisées par un défaut de l'hématopoïèse normale qui conduit à l'accumulation de cellules sanguines immatures, appelées blastes. Des traitements efficaces existent depuis quelques décennies, mais, mis à part l'allogreffe de moelle osseuse saine, aucun traitement n'est curatif. Cela est dû à la présence et l'apparition de cellules dites chimiorésistantes, qui adaptent leur métabolisme cellulaire pour gérer les stress rencontrés. Même si ces adaptations sont très bien connues à l'échelle de la cellule leucémique, le rôle et l'impact du microenvironnement médullaire est important et encore peu étudié. De même, à l'échelle systémique, de nombreuses reprogrammations ont lieu, dont certaines sont dues à la présence d'une maladie extra-médullaire caractérisée par des cellules leucémiques colonisant des organes distants. Ce phénomène n'est très souvent documenté qu'au moment de l'évaluation de la rémission. Cela concerne un quart des patients, qui pourraient constituer un nouveau sous-groupe d'étude. Afin d'évaluer ces adaptations aux niveaux tissulaires et systémique, j'ai pu mettre en place des méthodes de métabolomique *in vivo*, basées sur des méthodes de spectrométrie de masse. Cela m'a permis de caractériser les profils métaboliques des tissus naïfs de ma souris d'étude : la souris NSG, de caractériser les modulations de ces profils suite à une xénogreffe de deux lignées cellulaires de LAM (MOLM14 et U937), et suite à la réponse au traitement à la cytarabine. Enfin, j'ai pu identifier une signature plasmatique qui discrimine les cellules injectées en fonction de leur statut métabolique, ce qui pourra mener à l'identification de nouveaux biomarqueurs précoces de la chimiorésistance. Ces méthodes et ces analyses ouvrent la voie à de futures études des métabolismes tissulaires et systémiques, dans le cadre de certains sous-groupes de patients et de certains traitements ciblés. Ces recherches d'identification de biomarqueurs permettront ainsi d'offrir la meilleure option aux patients.

Abstract

Acute myeloid leukemias (AML) are the most common group of hematological malignancies. They are characterized by a blockade in healthy hematopoiesis, that leads to an accumulation of immature blood cells, called blasts. Efficient treatments exist to eradicate the blasts, but apart from bone marrow allografts being the sole curating treatment, patients frequently relapse. This is due to the presence and appearance of chemo resistant blasts. These cells have adapted their metabolism to meet the requirements of a stressful environment, mainly through an enhanced mitochondrial activity. Even though these adaptations are well known today on the leukemic cell scale, numerous adaptations on the tissue level appear, from nutrient sharing between cell types to the regulation of the immune response. Even though, many adaptations are yet to be discovered. Furthermore, numerous reprogramming appears at the systemic scale, and some are due to the presence of distant organs colonization by blasts as extra-medullar disease. This is often not well documented, eventually constituting a novel patient subgroup to study. To assess these adaptations at the tissular and systemic scales, I developed new *in vivo* metabolomic protocols based on mass spectrometry methods. These protocols allowed me to characterize the metabolic profiles of naïve NSG mice tissues, to characterize the modulations of these profiles post-leukemic engraftment and post-treatment with the chemotherapy: cytarabine. Finally, I identified plasma signatures of the metabolic state of injected AML cells. This result might lead to novel predictive biomarkers of chemoresistance. These methods and analyses are opening the path to future studies on tissular and systemic metabolism, that might help choosing the best option for patient treatment.

RESUMES

Résumé grand public

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont un groupe de cancers du sang caractérisés par un défaut de la production de cellules sanguines normales. Les cellules immatures qui sont produites s'accumulent chez le patient et empêchent le bon fonctionnement des cellules sanguines. Ces cancers répondent généralement très bien aux chimiothérapies proposées, mais la présence de quelques cellules résistantes aux traitements permet la rechute. Mon projet consiste en la mise au point des méthodes qui permettent de comprendre comment les cellules de LAM utilisent les nutriments à leur disposition pour se diviser ou gérer les stress d'une chimiothérapie. Ces méthodes de métabolomique m'ont permis d'étudier ces questions à l'échelle de l'organisme entier dans des modèles précliniques. Mon résultat majeur consiste en l'identification d'une signature plasmatique de métabolites prédictive des capacités de résistance des cellules leucémiques, qui nous permettra de proposer le traitement le plus efficace.

Lay abstract

Acute myeloid leukemias (AML) are a group of blood cancers characterized by the production of aberrant hematopoietic cells that blocks key functions (immune response or healing) of the blood. AML patients respond very well to chemotherapy. However, due to the presence of chemoresistant cells, patients frequently relapse. My project developed methods to study how AML cells use nutrients at their disposal to divide and cope the chemotherapy stresses. My main result consists in the identification of a plasma metabolite signature that determined before treatment whether the AML cells will be sensitive or resistant, allowing for a better choice of treatment for the patient.

Production scientifique

- **Cognet G**, Stuani L, Farge T, Gotanègre M, Heuillet M, Gales L, Rocher A, Lager-Lachaud N, Bosc C, Sabatier M, Saland E, Sahal A, Poillet-Perez L, Vergez F, De Mas V, Récher R, Bellvert F, Portais JC*, Sarry JE*. *In vivo* metabolomic study uncovers distinct metabolic phenotypes of host tissues and predicts oxidative state of acute myeloid leukemia. **Cancer & Metabolism** (preprint: DOI: 10.21203/rs.3.rs-719532/v1, **en révision**)
- Sabatier M, Boet E, Zaghdoudi S, Guiraud N, Hucteau A, Polley N, **Cognet G**, Saland E, Lauture L, Farge T, Sahal A, Pancaldi V, Chu-Van E, Castelli F, Bertoli S, Bories P, Récher C, Boutzen H, Mansat-De Mas V, Stuani L*, Sarry JE*. Activation of Vitamin D Receptor Pathway induces differentiation in Acute Myeloid Leukemia with Isocitrate Dehydrogenase mutations. **Cancers** (preprint: DOI: 10.20944/preprints202108.0529.v1, **accepté**)
- Bosc C, Saland E, Bousard A, Gadaud N, Sabatier M, **Cognet G**, Farge T, Boet E, Gotanègre M, Aroua N, Mouchel PL, Larrue C, Kaphan E, Sahal A, Jarrou L, Tolosini M, Rambow F, Polley N, Cabon F, Nicot N, Poillet-Perez L, Su X, Fovez Q, Kluzza J, Arguello RJ, Mazzotti C, Avet-Loiseau H, Vergez F, Tamburini J, Fournié JJ, Wei A, Kaoma T, Marine JC, Récher C, Stuani L, Joffre C, Sarry JE. Mitochondrial determinants of response and resistance to venetoclax plus cytarabine duplet therapy in acute myeloid leukemia. **Nature Cancer**. 2021 (**sous presse**)
- Stuani L, Sabatier M, Saland E, **Cognet G**, Poupin N, Bosc C, Castelli FA, Gales L, Turtoi E, Montersino C, Farge T, Boet E, Broin N, Larrue C, Baran N, Cissé MY, Conti M, Loric S, Kaoma T, Hucteau A, Zavoriti A, Sahal A, Mouchel PL, Gotanègre M, Cassan C, Fernando L, Wang F, Hosseini M, Chu-Van E, Le Cam L, Carroll M, Selak MA, Vey N, Castellano R, Fenaille F, Turtoi A, Cazals G, Bories P, Gibon Y, Nicolay B, Ronseaux S, Marszalek JR, Takahashi K, DiNardo CD, Konopleva M, Pancaldi V, Collette Y, Bellvert F, Jourdan F, Linares LK, Récher C, Portais JC, Sarry JE. Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. **Journal of Experimental Medicine**. 2021 May 3; 218(5):e20200924. doi: 10.1084/jem.20200924. PMID: 33760042; PMCID: PMC7995203.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, **Sophie Vasseur, Patrick Emond, Marc Billaud, Milica Vucetic** et **Pierre Sujobert** d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à vous tous pour les échanges très constructifs. Ce fut un plaisir pour moi d'avoir ces discussions.

Je tiens ensuite à remercier **Jean-Emmanuel Sarry** et **Jean-Charles Portais**, mes deux directeurs de thèse, de m'avoir permis d'entreprendre ce travail de thèse et pour ces trois années. Nos échanges ont été constructifs et j'ai énormément appris à vos côtés.

Je tiens également à remercier **Nathalie Bourgès-Abella** et **François Fenaille** d'avoir été présents pour mes comités de thèse et pour leur encouragements qui m'ont permis de continuer dans de bonnes conditions.

Merci **Lucille** pour ces trois années. Tu as monté ce projet, cru en moi et tu m'as suivi et supporté tout au long de ces trois années (et je t'en ai fait voir de toutes les couleurs !). J'ai énormément appris de toi et dans tous les domaines ! Tu m'as tellement apporté scientifiquement (merci pour ces journées de comptage hahaha), mais aussi sur le plan personnel. Si je sors de cette thèse avec autant de recul et de persévérance, et surtout avec cette magnifique opportunité à Chicago, c'est bien à toi que je le dois. Donc merci pour tout et à très bientôt !

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de mon équipe. C'est en écrivant ces remerciements que je me rends compte de la chance rare que j'ai eu de rencontrer tant de belles personnes en l'espace de trois ans. Vous avez su maintenir un environnement et une ambiance de travail très positive et j'ai énormément apprécié de vous côtoyer durant toutes ces journées manips, ces pauses café à rallonge et surtout ces sushis nights qui font apprécier ces longues journées.

Marie, quelle personne magnifique ! J'ai eu la chance d'apprendre de toi durant ces trois années et j'aime beaucoup la personne que j'ai découvert au détour d'un gâteau, d'un concert ou d'un thé ! Tu es gentille, attentionnée, mais également une pro des manips. Bref tu es une scientifique et une amie hors-pair ! Merci à toi et tes goûts musicaux, qui m'ont fait découvrir de belles pépites. Merci aussi pour tous ces moments partagés, qui m'ont permis de prendre avec plus de douceur cette thèse et ses difficultés.

REMERCIEMENTS

J'en profite pour faire un petit clin d'œil à **Corentin**. J'ai toujours aimé les concerts et les verres partagés !

Claudie, tu es une personne extraordinaire. Il ne te suffit pas de faire des triples journées de travail, mais tu prends également le temps de t'informer sur le monde qui t'entoure. Nos discussions m'ont montré à quel point tu es critique et tu sais rester optimiste. J'ai appris de toi que la persévérance peut nous amener très loin, pour autant que l'on agisse. Merci à toi et je vous rejoins bientôt, **Adrien** et toi, pour la suite à Chicago !

Thomas, j'ai adoré travailler avec toi. Nos échanges ont construit une grande part de ma réflexion scientifique et m'ont permis d'avancer toujours un peu plus loin la réflexion. Tu as des cultures scientifique, politique et culturelle tellement vastes. Merci pour ces trois ans !

Je te remercie également **Anne-Charlotte**. Je vous revois tous les deux très bientôt à Toulouse !

Estelle, merci à toi. Qu'importe la question, tu as la réponse ou tu sais où la trouver. Tu prêtes toujours ton oreille et ton aide, malgré les journées qui ne finissent jamais. Et, en plus d'être une scientifique confirmée, tu es devenue pour moi une amie avec qui partager une bière ou un gâteau (qu'est-ce qu'ils vont me manquer tes gâteaux...), mais surtout des discussions qui n'en finissent plus ! Merci à toi pour ces trois années de partage de bureau et merci pour ta belle amitié !

Merci aussi à toi **Mathilde** pour tous nos moments partagés. Tu es une très belle personne, qui a tant à offrir. Tu m'as permis d'avoir un début de thèse vraiment agréable. Merci à toi pour toutes nos pauses et ces week-ends partagés. Merci pour ton bon sens qui m'a permis de ne pas perdre de vue l'objectif. Je te souhaite bien du bonheur pour les prochaines étapes de ta vie. Merci également à toi **Jof** ! J'ai hâte de vous revoir tous les deux et de rencontrer la petite.

Laura, on a partagé un bureau seulement un an, mais j'ai eu la chance de découvrir quelqu'un de très honnête et de très drôle. Que ce soit pendant les covotages du matin, les pauses café ou les bières en fin de journée, nos discussions m'ont permis d'alléger grandement ma fin de thèse. Je te remercie énormément ! Bon courage pour les trois ans qui arrivent, et continues à prendre du plaisir à faire ton projet !

Coucou **Ambrine** ! J'ai aimé faire ta connaissance. Tu es une personne gentille, opiniâtre et tu as un sens de l'organisation à tout épreuve (sauf peut-être à celle de thésards en fin de thèse haha). Merci à toi et à bientôt !

Coucou également à **Emeline**, aka Meumeu. Accroche-toi bien pour la fin de ta thèse et surtout amuse toi ! Merci pour ces années partagées et à bientôt au détour d'un karaoké !

Je tiens également à remercier le reste de mes amis toulousains, qui ont su me soutenir pendant trois ans et qui devront encore me supporter longtemps !

Merci aux deux canetons, **Mathieu** et **Lorraine**. On aura encore plein d'occasions d'aller se perdre en montagne (je crois qu'il nous reste quelques points miles à utiliser pour se faire rapatrier des Pyrénées), de partager des séances d'escalade et de forger de nombreux autres souvenirs. Vous êtes tous les deux des personnes merveilleuses. Mathieu, tu es quelqu'un de très honnête et curieux. Lorraine, j'adore ton esprit de liberté et de voyage. Merci à vous deux et à bientôt quelque part sur cette planète !

Carine, ma petite caca. Merci à toi pour ta bonne humeur et ta joie de vivre. C'est toujours très agréable de partager du temps avec toi. Merci d'avoir écouté mes plaintes sans fin (quelle angoisse !) On se retrouvera bientôt pour de nouvelles aventures !

Lisa, malgré toutes ces occasions manquées où tu ne m'as pas invité (oui je le ressors encore !), on a passé de très beaux moments ensemble. Bonne chance pour cette thèse qui commence ! Prends soin de toi et un grand merci !

Coucou **Claire** ! Que de merveilleux souvenirs avec toi, que ce soit ce week-end dans ce refuge très particulier, notre soirée au Bikini avec Rone, ce match de rugby sous la pluie, ou encore toutes ces occasions de boire un verre ! Merci à toi, tu es une personne très intelligente et sensible. A bientôt !

Merci **Lilas**. On n'a pas eu l'occasion de se connaître aussi bien que je l'aurais voulu, mais je vois tes nombreuses convictions, ta gentillesse et ta curiosité. Toutes tes qualités font très chaud au cœur. Donc merci pour ces quelques moments d'escalade et ces quelques bières. On reste en contact et je viendrai te voir à l'occasion à Londres !

Je remercie également **Hanna, Lara, Noémie, Nina, Maud** et **Edern**, de la plateforme MetaToul. Grâce à vous, les trajets et le travail entre deux labos a été plus agréable. Bonne continuation à vous tous !

Ombeline, un merci tout spécial pour toi. On se connaît depuis un petit bout de temps maintenant, donc tu sais comme je tiens à toi. Cette thèse, je la dois aussi un peu à toi, car tu m'as soutenu avant, pendant et après. Je sais le nombre d'heures que tu as passé à m'écouter au téléphone, et tu as toujours les bons mots et les petites attentions qui permettent de se remettre en selle et repartir de plus belle. Certes, nos chemins divergent aujourd'hui, mais ils resteront connectés et, qui sait, ils se rejoindront sûrement encore dans une ville à l'autre bout du monde.

REMERCIEMENTS

Je tiens également à remercier ma famille. **Papa, Maman**, vous m'avez soutenu durant cette thèse pendant les moments de doutes et les week-ends où je rentrais. Merci à vous deux. Mais j'ai votre soutien depuis bien plus longtemps que le début de cette thèse. Donc merci à vous pour tout. Je vous dois cette thèse et bien plus ! Merci également à mon frère **Nicolas** et à ma sœur **Céline**.

Je remercie également tous ceux que je n'ai pas mentionné ici (**Mina, Anne, Bastien, Loredana, Alexandra, Guillaume L., Audrey, Jean, Nuria** et tant d'autres !). J'ai pu écrire cette thèse grâce à vous tous et nos échanges me permettent de partir grandi à Chicago. Merci énormément !

Table des matières

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract	6
Résumé grand public.....	7
Lay abstract	7
Table des matières	24
Liste des tableaux.....	25
Liste des figures.....	26
Abréviations	30
Les leucémies aiguës myéloïdes.....	36
Origine des leucémies	36
Hématopoïèse normale.....	36
Emergence des leucémies	38
Classification et pronostic	41
Traitements conventionnels.....	44
Nouvelles thérapies.....	45
Mécanismes de résistance thérapeutique	48
Métabolisme et LAM.....	52
Généralités	52
Organisation générale du métabolisme	52
Le métabolisme dans les cancers	54
Métabolisme des LAM.....	58
La dépendance à la glycolyse	58
Le métabolisme des acides aminés	64
Le métabolisme lipidique	72
Le métabolisme mitochondrial.....	76
Flexibilité métabolique et résistance aux traitements.....	84
Le métabolisme tissulaire et systémique	88
La moelle osseuse : le rôle et le soutien du microenvironnement	88
Maladie extra-médullaire et son pronostic dans les LAM.....	90
Implication de l'organisme dans les LAM.....	91
Hypothèses & Objectifs.....	96
Résultats.....	102
Chapitre I – Développement des méthodes métabolomiques <i>in vivo</i>	102
Les méthodes	102
Prélèvements des échantillons.....	103

TABLE DES MATIERES

Extraction des tissus	104
Analyse par LC-HRMS et validation des données.....	106
Discussion	114
Chapitre II – Etude métabolomique des systèmes métaboliques tissulaires et plasmatiques prédictifs de l’activité mitochondriale des LAM <i>in vivo</i>	120
Contexte	120
Résultats majeurs	120
Discussion et conclusion.....	121
Article soumis	126
Discussion Générale	156
Métabolisme à l’échelle cellulaire.....	156
Métabolisme intra-tumoral et son hétérogénéité.....	157
Métabolismes tissulaires.....	158
Métabolisme systémique	159
Identification de biomarqueurs métaboliques pertinents pour la prise en charge des patients ...	161
Bibliographie.....	170
Annexes	196
Annexe I - Protocole de prélèvement des tissus murins pour la métabolomique.....	196
Annexe II - Protocoles de prélèvement des tissus murins pour la métabolomique	198

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Classification OMS des LAM (révisée en 2016).....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 2. Classification des risques ELN.....</i>	<i>43</i>

Liste des figures

Figure 1. Hématopoïèse normale, avec marqueurs de surface (CD) associés.	38
Figure 2. Emergence mutationnelle des LAM.....	39
Figure 3. Leucémogénèse.	40
Figure 4. Classification FAB.....	41
Figure 5. Devenir des patients en fonction de leur catégorie de risques génétiques ELN 2017.	43
Figure 6. Nouveaux traitements approuvés par la FDA et l'EMA.	45
Figure 7. Schéma thérapeutique actuel des LAM.....	47
Figure 8. Exemple d'hétérogénéité clonale amenant à la résistance.	49
Figure 9. Voies métaboliques simplifiées.	53
Figure 10. Publications sur le métabolisme des cancers.	54
Figure 11. Connexions entre métabolisme et 'Hallmarks' du cancer.	55
Figure 12. La glycolyse dans les LAM.	61
Figure 13. Métabolisme des acides aminés dans les LAM.....	70
Figure 14. Régulation de la FAO et FAS par AMPK et PHD3.....	72
Figure 15. Molécules ciblant le métabolisme mitochondrial.....	78
Figure 16. Les ROS mitochondriaux.....	80
Figure 17. Apoptose mitochondriale.	81
Figure 18. Distribution par type cellulaire des cellules résidentes de la MO.....	88
Figure 19. Interaction entre LAM et tissus.	93
Figure 20. Etapes des méthodes d'analyse par spectrométrie de masse.....	103
Figure 21. Préparation et principe de l'IDMS.....	106
Figure 22. Principe de la chromatographie HILIC.....	107
Figure 23. Principe de la chromatographie ionique.....	108
Figure 24. Schéma d'un spectromètre de masse de type Orbitrap.....	109
Figure 25. Exemples de suivi de temps de rétention sur la séquence d'analyse.....	111
Figure 26. Exemple de chromatogrammes de l'arginine.....	112
Figure 27. Mesure de l'aire totale du signal IDMS dans les différents échantillons analysés.....	113
Figure 28. Exemples de la répétabilité des analyses.....	115
Figure 29. Répartition des blastes de 9 lignées LAM dans 8 tissus différents.....	159
Figure 30. Caractérisation clonale de différents tissus de souris atteintes de LAL.....	160
Figure 31. Prise en greffe des modèles compris dans l'analyse métabolomique des plasmas.....	163
Figure 32. Signature de la chimiorésistance.....	163
Figure 33. Schéma résumé.....	165
Figure 34. Schéma de dissection des souris.....	197

Abréviations

Abréviations

¹¹C-MET – Méthionine marquée au carbone 11	BCKA – Cétoacide branché
1-MT – 1-méthyltryptophane	BM – Moelle osseuse
2-DG – 2-déoxyglucose	BRQ – Brequinar
2-HG – D-2-hydroxyglutarate	C1 – Carbone en position 1
3-BP – 3-bromopyruvate	CB-839 – Telaglenastat
3PG – 3-phosphoglycérate	CBF – Core Binding Factor
6AN – 6-nicotinamide	CD – Cluster de différenciation
A2-32-01 – Inhibiteur de ClpP	CDA – Cytidine déaminase
AA – Acide aminé	CEBPa – CCAAT/enhancer-binding protein alpha
ABT-199 – Venetoclax	Cit – Citrate
ABT-263 – Navitoclax	CKMT1 – Créatine kinase U-type, mitochondrial
ABT-737 – Inhibiteur de BCL2 et BCL-xL	CLP – Progéniteur lymphoïde commun
ACC – Acétyl-CoA carboxylase	CLpP – Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic Subunit
ADI – Arginine déiminase	CM – Métabolites centraux
ADI-PEG – ADI-pegylated	CMA – Chaperone-mediated autophagy
ADP – Adénosine diphosphate	CMP – Progéniteur myéloïde commun
ADN – Acide désoxyribonucléique	CoA – Coenzyme A
ARN – Acide ribonucléique	CoQ₁₀ – Coenzyme Q10
AG-221 – Enasidenib	CPI-613 – Inhibiteur de la pyruvate deshydrogenase
Ala – Alanine	CPT1a – Carnitine palmitoyltransferase 1A
aKG – Alpha-cétoglutarate	CSH – Cellule souche hématopoïétique
AKT – Protéine kinase B	CSH-CT - Cellule souche hématopoïétique à court terme
ALDH3A2 – Aldehyde déshydrogénase 3 family member A2	CSH-LT – Cellule souche hématopoïétique à long terme
AML – Leucémie aiguë myéloïde	CSL – Cellule souche leucémique
AML-MRC – Evolution d’une myélodysplasie en LAM	CT2 – Carnitine transporter 2
AMP – Adénosine monophosphate	CTP – Cytidine triphosphate
AMPK – AMP-activated protein kinase	CYP3A4 – Cytochrome P450
Ang-2 – Angiopoietin 2	CYS – Cystéine
APR-246 – Eprenetopopt	CYSase – Cystéinase
AraC – Cytarabine	DC – Cellule dendritique
AraU – Arabinouridine	DFO – Deferoxamine
Arg – Arginine	DFX – Deferasirox
ARGase – Argininase	DHF – Dihydrofolate
ARN – Acide ribonucléique	DHFR – Dihydrofolate réductase
ASH – American Society of Hematology	DHO – Dihydroorotate
ASN – Asparagine	DHODH – Dihydroorotate déshydrogénase
ASNase – Asparaginase	DNA – Acide désoxyribonucléique
Asp – Aspartate	DNMT3A – DNA methyltransferase 3 alpha
ASS1 – Argininosuccinate synthase 1	DOT1L – DOT 1-like histone lysine methyltransferase
ASXL1 – Additional sex combs-like transcriptional regulator 1	EGLN1 – Egl-9 family hypoxia inducible factor 1
ATF4 – Activating transcription factor 4	ELN – European Leukemia Net
ATP – Adénosine triphosphate	ELT – Elthrombopag
ATRA – Acide tout- <i>trans</i> -rétinoïque	EMA – European Medicines Agency
AZA – Azacytidine	EOBP – Progéniteur éosinophile-basophile
BAK – BCL2 homologous antagonist killer	ERK – Extracellular signal regulated kinase
BaP – Bezafibrate & medroxyprogesterone acetate	ETC – Chaîne de transfert d’électron
BAX – BCL2-associated X protein	EV11 – Ecotropic virus integration site 1 protein homolog
BCAA – Acide aminé branché (Leucine, isoleucine, valine)	
BCAT – BCAA transaminase	
BCL2 – B Cell Lymphoma 2	

ABREVIATIONS

EVT-701 – Inhibiteur du complexe 1 de la chaîne respiratoire
F1P – Fructose-1-phosphate
F6P – Fructose-6-phosphate
FAB – Franco-Américano-Britannique
FAD – Flavine adénine dinucléotide, oxydé
FADH₂ – Flavine adénine dinucléotide, réduit
FAO – β -oxydation des acides gras
FAS – Synthèse des acides gras
FASN – Fatty acid synthase
FDA – Food and Drugs Administration
Fe-S – Complexe Fer-Soufre
FH – Fumarate hydratase
FIS1 – Mitochondrial fission 1 protein
FLT3 – FMS-like tyrosine kinase 3
FLT3^m – Mutation de FLT3
FOXO – Forkhead box
FTCD – Formimidoyltransférase cyclodéaminase
G6P – Glucose-6-phosphate
G6PD – G6P déshydrogénase
GATA2 – Facteur de transcription reconnaissant le motif GATA sur l'ADN
GCLC – GLU-CYS ligase, sous-unité catalytique
Glc – Glucose
Gln – Glutamine
GLP-1 – Glucagon-like peptide 1
GLS – Glutaminase
Glu – Glutamate
GLUT – Glucose transporter
Gly – Glycine
Gly-3P – 3-phosphoglycérate
GMP – Progéniteur granulocyte-monocyte
GOT1 – Glutamate-oxaloacétate transaminase 1
GPI – G6P isomérase
GPNA – L- γ -Glutamyl-p-nitroanilide
GSH – Glutathion réduit
GSSG – Glutathion oxydé
GTP – Guanosine triphosphate
HIF – Hypoxia-induced factor
HILIC – Chromatographie d'interaction hydrophile
HIS – Histidine
HK – Hexokinase
IACS-010759 – Inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire
IDH – Isocitrate déshydrogénase
IDH^m – Mutation de IDH
IDO1 – Indoleamine 2,3-dioxygénase 1
IGFBP1 – Insulin-like growth factor-binding protein 1
ILC – Cellules lymphoïdes innées
IMP – Inosine monophosphate
ITD – Internal tandem duplication
JAK2 – Janus kinase 2
KGHDH – α -cétoglutarate déshydrogénase
KHK – Ketohexokinase
KIT – Tyrosine-protein kinase kit

KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Lac – Lactate
LAL – Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM – Leucémie aiguë myéloïde
LC-HRMS – Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse à haute résolution
LDAC – Low dose AraC
LDH – Lactate déshydrogénase
LEU – Leucine
LMPP – Progéniteur multipotent amorcé dans la lignée lymphoïde
m/z – Ratio masse sur charge
MAPK – Mitogen-activated protein kinase
MCL1 – Myeloid Cell Leukemia Sequence 1
ME344 – Inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire
MEM – Maladie extra-médullaire
MEP – Progéniteur mégacaryocyte-érythroïde
MET – Méthionine
Metf – Metformine
MLL – Mixed Lineage Leukemia
MLL-AF9 – Mixed Lineage Leukemia-AF9
MO – Moelle osseuse
MPP – Progéniteur multipotent
mTOR – Mammalian target of rapamycin
mTORC1 – Mammalian target of rapamycin complex I
mPTP – Pore de transition de perméabilité mitochondriale
NAD(P)⁺ – Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate), oxydé
NAD(P)H – Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate), réduit
NCTxxxxxxx – National Clinical Trial
Nf- κ B – Nuclear factor-kappa B
NK – Natural killer
NLN – Neurolysin
NO – Oxyde nitrique
NPM1 – Nucléophosmine
NRAS – Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
NSG – NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ
NVP-BKM120 – Buparlisib
O₂ – Dioxygène
O₂⁻ – Anion superoxyde
OMS – Organisation mondiale de la santé
ONC201 – Inhibiteur des protéases
ONC212 – Inhibiteur des protéases
Oro – Orotate
OxPHOS – Oxydations phosphorylantes
p53 – Tumor protein 53
p62 – Sequestosome 1
PARL – Presenilins-associated rhomboid-like protein
PDH – Pyruvate déshydrogénase
PDK – PDH kinase

PE – Phosphatidyléthanolamine	SAH – S-adénosylhomocystéine
PEP – Phosphoenolpyruvate	SAM – S-adénosylméthionine
PET-SCAN – Positron emission tomography	SCO2 – Cytochrome C oxidase assemblu protein
PGM – Phosphoglucomutase	SCT – Allogreffe de moelle osseuse
PHD3 – Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein 3	SDHA – Succinate déshydrogénase A
PHGDH – Phosphoglycérate déhydrogénase	SER – Sérine
PI3K – Phosphoinositol 3-kinase	SF3B1 – Splicing factor 3B subunit 1
PITRM1 – Pitrilysin Metallopeptidase 1	SHD – SRC homology 2 domain containing transforming protein D
PKM – Pyruvate kinase, muscle	SHMT2 – Sérine hydrxyméthyltransférase 2
PL – Progéniteur leucémique	SLCxAy – Solute carrier family x member y
PML-RARα – Promyelocytic leukemia/Retinoic acid recepteur alpha	SMD – Syndrome myélodysplasique
PPP – Voie des pentoses phosphates	SOD – Superoxide dismutase
PSAT1 – Phospho-sérine aminotransférase 1	SPHK1 – Sphingosine kinase 1
PTC299 – Inhibiteur de la DHODH	SRSF2 – Serine and arginine-rich splicing factor 2
PTPMT1 – Protein tyrosine phosphatase mitochondrial 1	TET – Ten-eleven translocation
PTPN11 – Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11	THF – Tétrahydrofolate
Pyr – Pyruvate	TKD – Tyrosine kinase domain
QC – Contrôle qualité	TP53 – Tumor protein 53
R5P – Ribose-5-phosphate	TRP – Tryptophane
RAS – Rat sarcoma virus	TTP – Thymidine triphosphate
RC – Rémission complète	UTP – Uridine triphosphate
Rib5P – Ribose-5-phosphate	VDAC – Voltage-dependent anion channel
ROS – Espèces réactives de l'oxygène	VEGF – Vascular endothelial growth factor
RS – Sidéroblaste en couronne	VEN – Venetoclax
RUNX1 – Runt-related transcription factor 1	VLCAD – Very long chain acyl-CoA dehydrogenase
RUNX1T1 – RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1	VLX 600 – Chélateur de fer
	WT1 – Wilms tumor
	WQ-2101 – Inhibiteur de PHGDH
	xCT – Cystine/glutamate transporter
	XRF3F2 – Inhibiteur de p62

Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) regroupent un ensemble d'hémopathies malignes caractérisées par le blocage en différenciation des cellules hématopoïétiques progénitrices de la moelle osseuse (MO). Ces cellules, nommées aussi blastes leucémiques, prolifèrent de façon incontrôlée et la MO se sature en cellules immatures, empêchant ainsi l'hématopoïèse normale. L'absence de différenciation des blastes en cellules matures entraîne chez les patients des infections opportunistes et des hémorragies, responsables de la plupart des décès^{1,2}. Les LAM sont les formes les plus communes de leucémies aiguës chez l'adulte (80%). L'incidence des LAM en Europe est estimée à 3.5 cas pour 100 000 habitants³ et la survie à 5 ans est de 17.5%³.

Origine des leucémies

Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est le processus de production des lignées cellulaires sanguines. Prenant principalement place dans la MO, elle repose sur la présence et le maintien d'une population rare de cellules souches hématopoïétiques (CSH). La notion de cellule souche a été pour la première fois proposée en 1868 par Haeckel⁴, qui la définit comme la première cellule, à l'origine de toutes les cellules apparaissant au cours de la vie d'un organisme. Ce modèle a ensuite été proposé dans le cadre de l'hématopoïèse et des CSH par Pappenheim⁵. Les CSH ont été mises en évidence à partir des années 1950 chez l'homme avec la première transplantation de MO chez un patient irradié⁶, et chez la souris xénogreffée avec l'apparition et le compte de colonies spléniques post-greffe⁷. Cette deuxième étude a notamment permis d'évaluer la fréquence des CSH à 1/10 000 cellules de la MO, en faisant des cellules rares. Les études sur les CSH ont connu leur essor avec l'utilisation de la cytométrie de flux en 1988⁸ et ont permis l'établissement de nombreux modèles de la structure de l'hématopoïèse, basés sur la détection de marqueurs de surface.

L'hématopoïèse a tout d'abord été pensée comme un arbre phylogénétique, avec en premier précurseur les CSH à long terme (CSH-LT), se différenciant en CSH à court terme (CSH-CT), puis en deux populations progénitrices distinctes des lignées myéloïdes et lymphoïdes (CMP et CLP). La caractérisation de nouveaux marqueurs de surface a permis de réviser le modèle, prenant compte de l'hétérogénéité phénotypique des CSH (**Figure 1**)⁹⁻¹¹. Ces modèles sont aujourd'hui revisités avec l'émergence de nouvelles techniques de séquençage et de transcriptomique sur cellule unique. L'hématopoïèse est maintenant vue comme un procédé hautement flexible et graduel¹², et ce afin de répondre aux besoins en cellules sanguines de l'organisme qui peuvent fluctuer en réponse aux stress¹³⁻¹⁶ (**Figure 1**).

INTRODUCTION

L'hématopoïèse normale est fortement liée aux modifications du métabolisme cellulaire (**voir section « Métabolisme des LAM » ci-dessous page 58**). La première caractéristique des CSH est leur capacité d'autorenouvellement et leur quiescence^{13,17,18}. Cela permet d'assurer l'hématopoïèse tout au long de la vie d'un organisme en limitant le nombre de divisions, et donc le risque de mutations délétères. Elles sont alors caractérisées par un statut glycolytique élevé^{19,20}, une dépendance à l'autophagie importante^{21,22} et à la β -oxydation des acides gras^{23,24}, et ont un métabolisme mitochondrial^{19,25,26} et une synthèse protéique²⁷ assez faible. Cela limite les stress oxydants, souvent responsables de mutations, et la production de biomasse nécessaire à la prolifération. La deuxième caractéristique des CSH est leur capacité à initier la production de toutes les lignées myéloïdes et lymphoïdes. Ceci nécessite une reprogrammation métabolique leur permettant d'entrer en prolifération élevée. Ainsi leur dépendance aux lipides est diminuée^{23,24}, leur statut glycolytique^{20,23}, leur métabolisme mitochondrial²⁸ et leur utilisation de la glutamine augmentés (**Figure 1**).

L'hématopoïèse est un processus complexe encore en cours d'étude, mais les découvertes des dernières années montrent l'hétérogénéité des CSH, expliquée par une hématopoïèse continue et flexible²⁹. Cette hématopoïèse est accompagnée de changements phénotypiques clés, induits en partie par une grande flexibilité métabolique. De ce processus émergent les leucémies, caractérisées par une hétérogénéité et une capacité d'adaptation métabolique importantes, cruciales dans le développement de la maladie et la réponse aux différents traitements (**voir section « Mécanismes de résistance thérapeutique » ci-dessous page 48**).

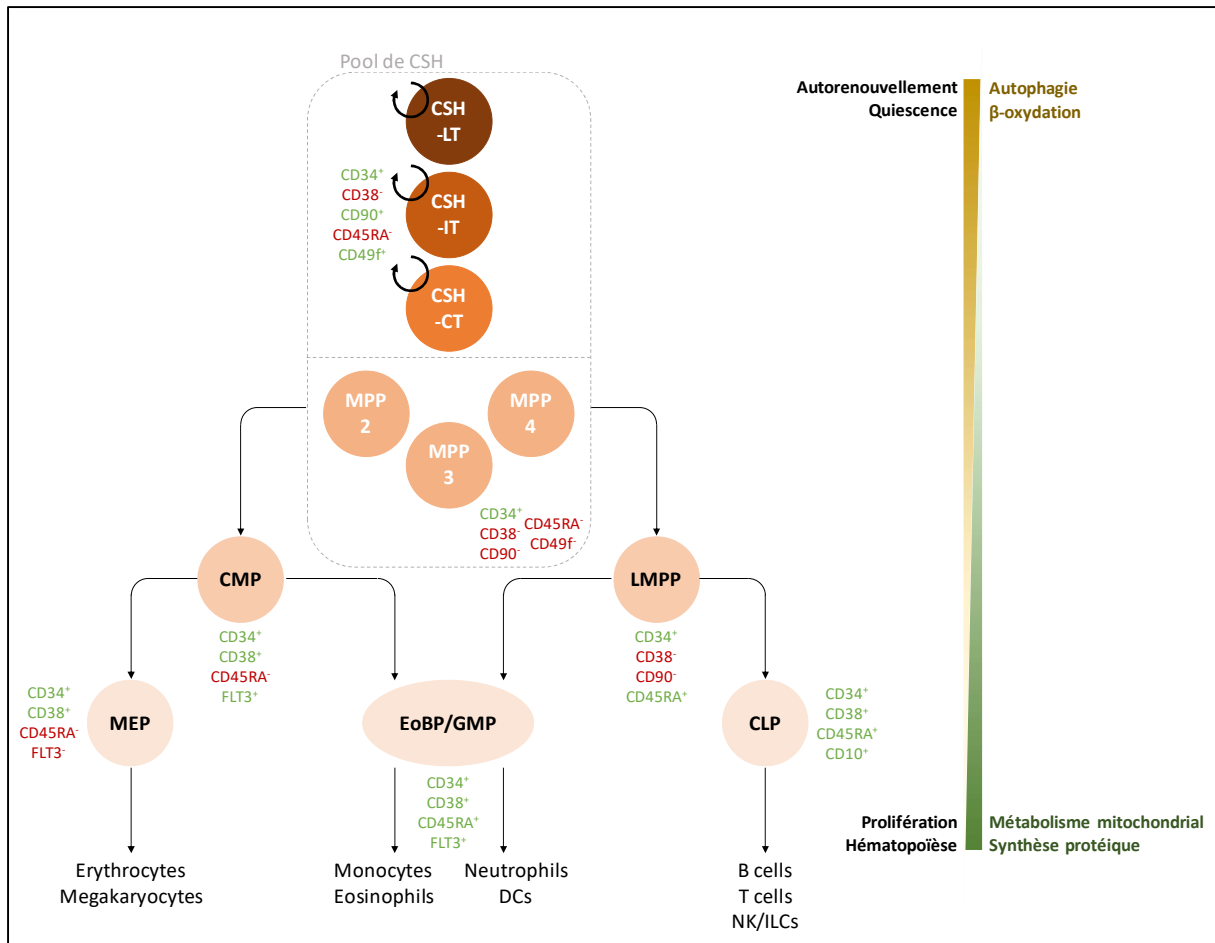


Figure 1. Hématopoïèse normale, avec marqueurs de surface (CD) associés.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine des lignées de cellules progénitrices et des lignées cellulaires de l'hématopoïèse. (LT, long terme ; IT, intermédiaire ; CT, court terme ; MPP, progéniteur multipotent ; CMP, progéniteur myéloïde commun ; LMPP, progéniteur multipotent amorcé dans la lignée lymphoïde ; MEP, progéniteur mégacaryocyte-érythroïde ; EoBP, progéniteur éosinophile-basophile ; GMP, progéniteur granulocyte-monocyte ; CLP, progéniteur lymphoïde commun ; DC, cellule dendritique ; NK, natural killer ; ILC, cellules lymphoïdes innées) (adapté de *Laurenti & Göttgens*³⁰ et de *Patel et al.*³¹)

Emergence des leucémies

Les leucémies émergent à différents stades de l'hématopoïèse (**Figure 3**). Des réarrangements chromosomiques, tels que t(v ;11q23) ou t(8 :21), permettent la formation de protéines dites de fusion leucémogènes, telles que MLL (Mixed Lineage Leukemia) ou CBF (Core Binding Factor)³¹. De plus, dans près de 97% des LAM étudiées³¹, la présence de mutations géniques entraînent elles aussi un avantage prolifératif et une détérioration des capacités de différenciation^{32,33}. Des mutations initiales permettent à la cellule d'obtenir des avantages de survie, comme des capacités accrues de prolifération, d'évasion à l'apoptose ou de répliation illimitée. Des exemples de ces mutations sont les régulateurs épigénétiques DNMT3A, ASXL1 et TET2, les protéines du spliceosome SF3B1 et SRSF2,

INTRODUCTION

ou les facteurs de transcription RUNX1, CEBPa et GATA2. L'avantage de survie acquis par la cellule permet l'émergence de mutations secondaires, comme les enzymes métaboliques IDH1 et IDH2, les protéines impliquées dans la signalisation JAK2, NRAS, FLT3 et TP53, ou encore la protéine chaperon NPM1³⁴⁻³⁶. Ainsi, les avantages de survie s'accumulent, faisant émerger les cellules souches leucémiques (CSL) qui colonisent la MO (Figure 2).

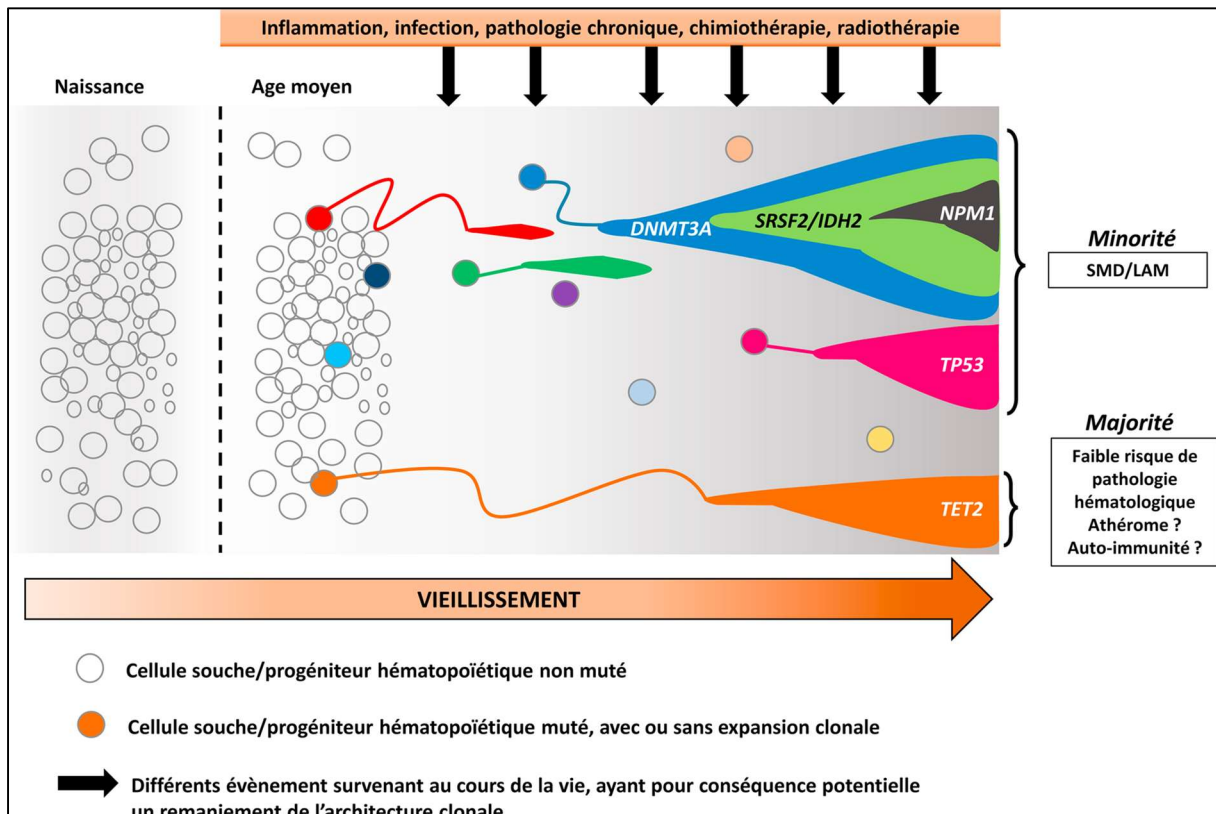


Figure 2. Emergence mutationnelle des LAM
(Danlos et al.³⁴)

Bien qu'au départ décrites comme dérivant de CSH mutées³⁷, les CSL peuvent apparaître à différents stades de l'hématopoïèse³⁸⁻⁴². C'est le cas des cellules portant certaines mutations spécifiques, telles MLL-AF9. L'inhibition de la différenciation en GMP de ces cellules mutées empêche la leucémogénèse⁴³. Des études ont aussi démontré le caractère souche de cellules en différenciation avancée³⁸, ainsi que la capacité de dédifférenciation de cellules différenciées⁴⁴, montrant l'hétérogénéité et la flexibilité des cellules leucémiques. Les CSL émergentes forment ainsi des populations de blastes immatures qui envahissent la moelle osseuse du patient au détriment de l'hématopoïèse normale (Figure 3).

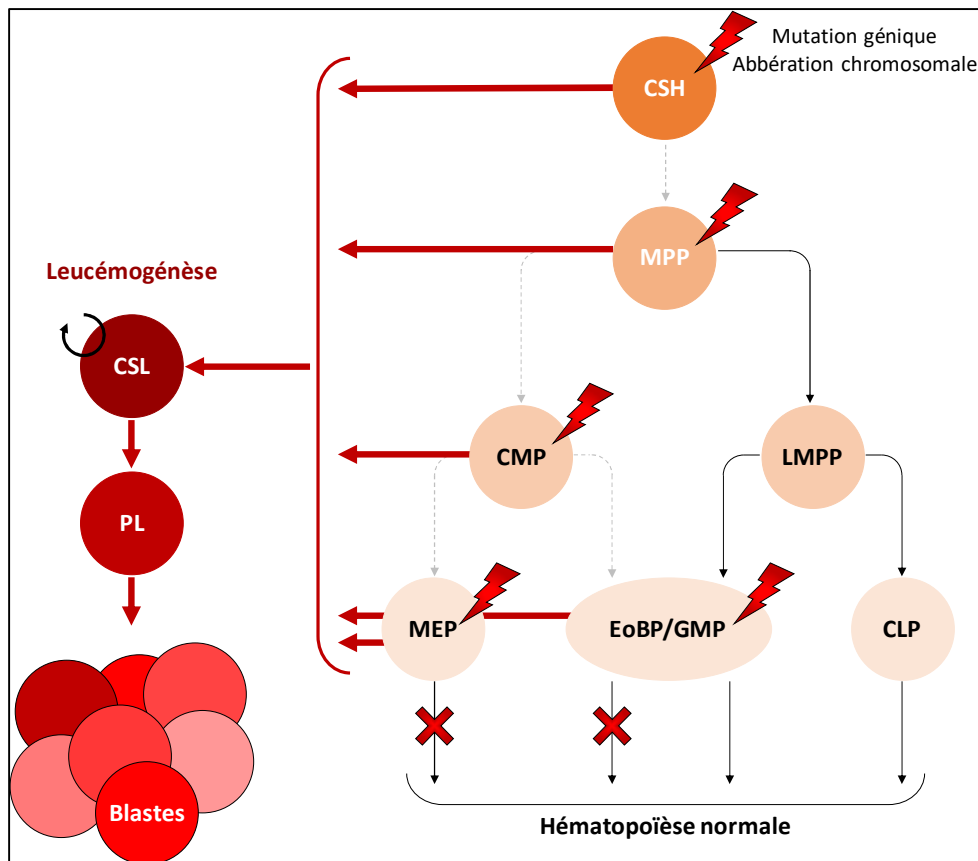


Figure 3. Leucémogénèse.

Les cellules souche leucémiques (CSL) émergent de l'hématopoïèse normale suite à des événements mutagènes. (CSH, cellule souche hématopoïétique ; MPP, progéniteur multipotent ; CMP, progéniteur myéloïde commun ; LMPP, progéniteur multipotent amorcé dans la lignée lymphoïde ; MEP, progéniteur mégacaryocyte-érythroïde ; EoBP, progéniteur éosinophile-basophile ; GMP, progéniteur granulocyte-monocyte ; CLP, progéniteur lymphoïde commun ; CSL, cellule leucémique souche ; LP, progéniteur leucémique)

Tout comme l'hématopoïèse normale, plusieurs marqueurs de surface permettent de définir les CSL. Ces marqueurs ne se retrouvent cependant pas chez tous les patients. Par exemple, le marqueur CD34 est exprimé sur les CSL de 70% des patients⁴⁵, démontrant déjà de l'hétérogénéité retrouvée chez les patients. De nouveaux marqueurs des CSL sont identifiés graduellement, comme CALCRL^{46,47}, permettant de préciser l'hétérogénéité phénotypique des CSL et des blastes leucémiques, et d'affiner le diagnostic des patients.

INTRODUCTION

Classification et pronostic

Les LAM étant une classe très hétérogène d'hémopathies, une classification a été mise en place dans les années 1970, sur des critères morphologiques de différenciation. Cette classification, dite FAB (Franco-Américano-Britannique) est basée sur l'étude de myélogrammes de la MO (**Figure 4**)⁴⁸.

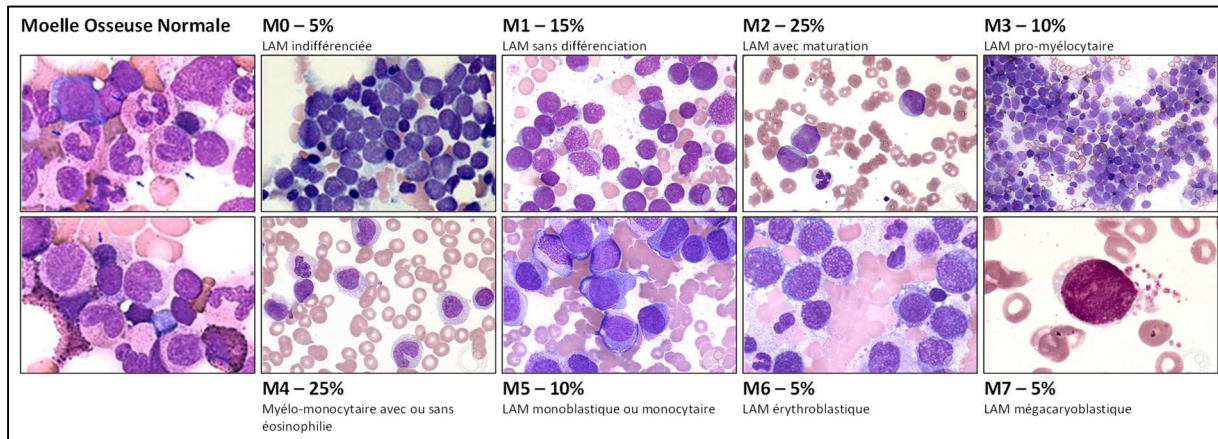


Figure 4. Classification FAB
(Source : ASH Image Bank)

Cependant, de nombreuses découvertes, en particulier génétiques, ont mené l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) à revisiter cette classification en 2016, pour y intégrer des caractéristiques comme la génétique des blastes leucémiques ou l'origine de la maladie (**Tableau 1**)⁴⁹. Cette classification a permis à l'ELN (European Leukemia Net) de catégoriser les LAM en trois catégories de risques cytogénétiques: favorable, intermédiaire et adverse (**Tableau 2, Figure 5**)^{50,51}.

Tableau 1. Classification OMS des LAM (révisée en 2016)

Type de LAM	Caractéristiques
LAM avec anomalies génétiques récurrentes	<ul style="list-style-type: none"> - LAM avec t(8;21)(q22;q22.1) ; RUNX1-RUNX1T1 - LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; CBFβ-MYH11 - Leucémie promyélocytaire avec PML-RARA - LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3) ; MLLT3-KMT2A - LAM avec t(6;9)(p23;q34.1) ; DEK-NUP214 - LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; GATA2, MECOM - LAM avec (mégacaryoblastique) with t(1;22)(p13.3;q13.3) ; RBM15-MKL1 - LAM avec BCR-ABL1 - LAM avec mutation NPM1 - LAM avec mutations bi-alléliques de CEBPA - LAM avec mutation RUNX1
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies	<ul style="list-style-type: none"> - Soit consécutives à un syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif - Soit avec anomalie(s) cytogénétique(s) de syndrome myélodysplasique
LAM induites par une thérapie	<ul style="list-style-type: none"> - Suite à l'utilisation d'agents alkylants ou d'autres composés dans le cadre du traitement d'un autre cancer
LAM sans spécificité particulière	<ul style="list-style-type: none"> - LAM avec différenciation minimale - LAM avec sans maturation - LAM avec maturation - Leucémie myélo-monocytaire - Leucémie aiguë monoblastique ou monocytique - Leucémie aiguë érythroïde pure - Leucémie aiguë mégacaryoblastique - Leucémie aiguë myéloblastique à composante basophile - Leucémie pan-myéloïde avec myélofibrose
Sarcome myéloïde	<ul style="list-style-type: none"> - Sarcomes myéloïdes de novo sans évidence de maladie médullaire
Syndrome de Down	<ul style="list-style-type: none"> - Myélopoïèse transitoire anormale (ou TAM) - Leucémie myéloïde associée au Syndrome de Down
Néoplasie à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques	<ul style="list-style-type: none"> - Monocyte plasmacytoïde CD4+CD56+
Leucémies aiguës à lignage ambigu	<ul style="list-style-type: none"> - Leucémie aiguë indifférenciée - LAM avec phénotype mixte t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 - LAM avec phénotype mixte t(v;11q23); réarrangement MLL - LAM avec phénotype mixte, myéloïde/B - LAM avec phénotype mixte, myéloïde/T

INTRODUCTION

Tableau 2. Classification des risques ELN

Risque	Anomalie cytogénétique
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> - t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 - inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 - Mutation NPM1 sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD_{low} - Mutation bi-allélique CEBPA
Intermédiaire	<ul style="list-style-type: none"> - Mutation NPM1 et FLT3-ITD_{high} - Sauvage NPM1 sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD_{low} (caryotype normal) - t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A - Anomalies cytogénétiques non classifiées dans favorable ou défavorable
Défavorable	<ul style="list-style-type: none"> - t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 - t(v;11q23.3); KMT2A réarrangé - t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 - inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1) - -5 ou del(5q); -7; -17/abn(17p) - Caryotype complexe; Caryotype monosomal - Sauvage NPM1 et FLT3-ITD_{high} - Mutation RUNX1 - Mutation ASXL1 - Mutation TP53 - Ratio allélique

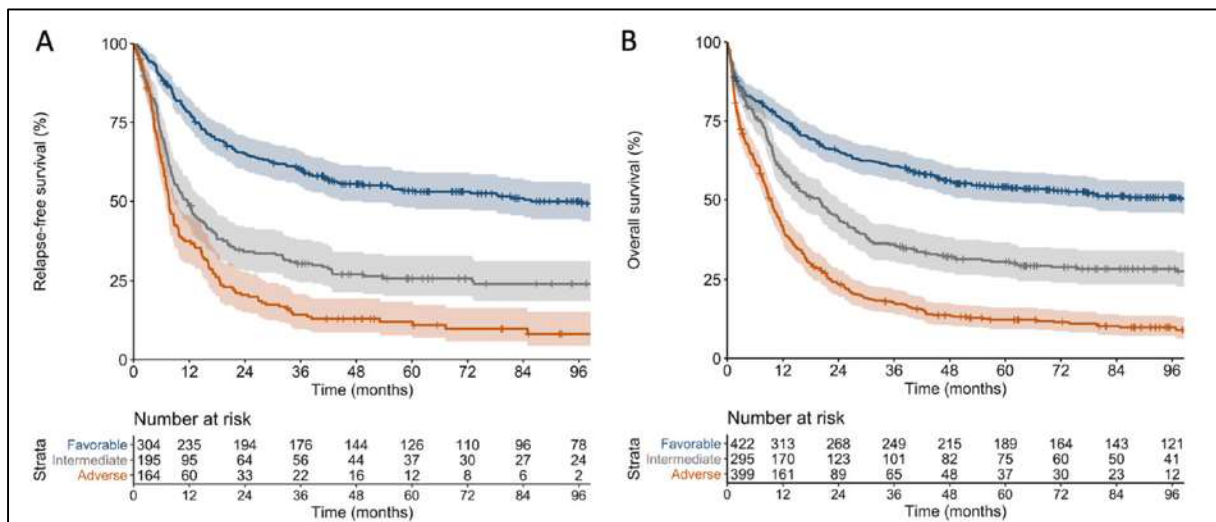


Figure 5. Devenir des patients en fonction de leur catégorie de risques génétiques ELN 2017.

a. Survie sans rechute et b. survie globale selon la catégorie ELN-2017 dans la cohorte *Herold et al.*⁵¹ de 1116 patients (18-86 ans)

Traitements conventionnels

Les traitements conventionnels appliqués aux patients varient en fonction de leur catégorie de risque, de leur âge et de leur état général.

Pour des patients de **moins de 60 ans**, ayant la capacité de suivre une chimiothérapie intensive, le traitement en première intention consiste en une phase d'induction standard, composée d'une combinaison de cytarabine (AraC), administré à 100-200 mg/m² (surface corporelle) pendant 7 jours et d'un antibiotique anti-tumoral (daunorubicine ou idarubicine), administré pendant les 3 premiers jours. Cette combinaison est nommée 7+3. L'objectif de cette phase d'induction est d'atteindre une rémission complète (RC), définie par la détection de blastes dans la moelle osseuse inférieure à 5%, la restauration de l'hématopoïèse périphérique normale (taux normaux de neutrophiles et de plaquettes), et l'absence de besoin de transfusion sanguine^{50,52}. Pour une génétique favorable, la RC est atteinte dans 80% des cas⁵³. L'allogreffe de moelle osseuse est alors envisagée pour des patients compatibles avec un donneur sain, afin de reconstituer l'hématopoïèse normale^{53,54}. Lorsque l'allogreffe n'est pas envisageable, le traitement entre en seconde phase, dite de consolidation, visant à prévenir la rechute. Celle-ci consiste en une combinaison de fortes doses d'AraC (1-3 g/m²) avec des antibiotiques anti-tumoraux.

Pour des patients de **plus de 60 ans**, le traitement décrit précédemment est envisagé lorsque les risques de toxicité et de résistance ne sont pas importants. Dans le cas contraire, l'azacytidine, un agent hypométhylant, est habituellement utilisée, avec des taux de réponses assez bas. Cependant, les nouvelles thérapies discutées dans le paragraphe suivant ont permis l'émergence de nouvelles combinaisons thérapeutiques plus favorables⁵⁵⁻⁵⁷.

Bien que la survie à 5 ans est atteinte dans plus de 60% des cas chez les personnes âgées de moins de 50 ans, elle chute à moins de 10% chez celles de plus de 65 ans⁵⁸. Les patients rechutent, suite à l'émergence de clones résistants, non ou peu détectés à la rémission. En effet, un des critères de rémission complète est la présence de moins de 5% de blastes dans la moelle osseuse⁵⁹. Il existe ainsi une maladie résiduelle, en dessous des seuils de détection, qui est à l'origine d'une recolonisation de la moelle osseuse et de la rechute. L'enjeu actuel est de caractériser cette maladie résiduelle afin de proposer de nouveaux traitements aux patients (**voir également la section « Nouvelles thérapies » page 45**).

Il existe un sous-groupe particulier de LAM : la sous-groupe M3 de la classification FAB. Ce sous-groupe est défini par la présence du gène de fusion PML-RAR α . Cela entraîne un blocage en différenciation qui peut être contourné à l'aide d'une combinaison d'acide tout-*trans*-rétinoïque et de trioxyde d'arsenic. Ce traitement permet près de 90% de rémission dans ce sous-groupe⁶⁰.

INTRODUCTION

Nouvelles thérapies

La cytarabine a été pour la première fois approuvée en 1969 pour le traitement des LAM. Après un quart de siècle, de nouvelles thérapies ont été approuvées depuis 2017 par les différents organismes de santé (Food and Drugs Administration, ou FDA, en Amérique du Nord ; European Medicines Agency, ou EMA, en Europe ; **Figure 6 & Figure 7**)⁶¹⁻⁶³.

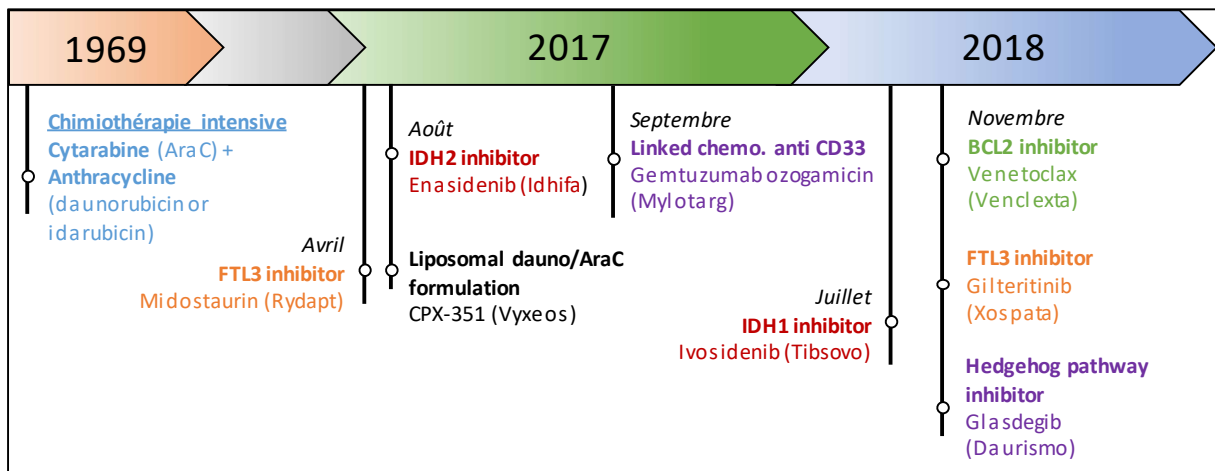


Figure 6. Nouveaux traitements approuvés par la FDA et l'EMA.

i. Les inhibiteurs de FLT3^{m64} : FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3), ou CD135, est un récepteur tyrosine kinase. Impliqué dans la signalisation de la survie cellulaire, de la prolifération et de la différenciation, ce récepteur peut être muté et participer au développement d'une leucémie. Les mutations de FLT3 sont divisées en deux groupes principaux : FLT3-TKD (tyrosine kinase domain), caractérisée par une mutation dans la boucle d'activation du récepteur, et FLT3-ITD (internal tandem duplication), caractérisée par une duplication dans le domaine d'inhibition du récepteur. Ces deux types de mutation entraînent une activation constitutive de FLT3, promouvant ainsi la survie des cellules mutées. Les mutations FLT3-ITD sont retrouvées dans près d'un tiers des patients atteints d'une leucémie^{65,66} et font partie de la liste des mutations permettant la stratification des risques LAM ELN⁵⁰. Il existe à ce jour deux inhibiteurs de FLT3^m approuvés pour le traitement des patients : la midostaurin, inhibiteur de première génération agissant sur les deux types de mutation et sur d'autres kinases telles qu'AKT ou KIT⁶⁷, et le gilteritinib, inhibiteur de seconde génération, plus spécifique et ciblant les deux types de mutation⁶⁸. Malgré des résultats encourageants, les cas de rechute sont fréquents⁶⁹ et les mécanismes de résistance, en dehors de l'émergence de nouvelles mutations⁷⁰, restent encore à étudier.

ii. Les inhibiteurs d'IDH^{m71} : Les isocitrate déshydrogénases (IDH) sont une famille d'enzymes catalysant la conversion de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate (aKG). Il existe trois formes de ces enzymes : IDH1, cytosolique, IDH2 et IDH3, mitochondriales. Une mutation d'IDH1 ou IDH2 entraîne la formation d'un oncométabolite, le D-2-hydroxyglutarate ou 2-HG⁷². Ce métabolite, proche structurellement de l'aKG, est un inhibiteur compétitif des dioxygénases aKG-dépendantes, dont les familles d'enzymes responsables de la déméthylation de l'ADN et des histones. Ceci entraîne un phénotype d'hyperméthylation⁷³, et un arrêt en différenciation des cellules IDH^{m74}. Les mutations d'IDH1/2 induisent aussi une reprogrammation métabolique importante, discutée dans la partie suivante. Ces mutations sont rencontrées dans 15 à 20% des cas de LAM^{65,75}. Deux inhibiteurs sont approuvés pour le traitement des patients IDH^m : l'ivosidenib, inhibant l'activité enzymatique d'IDH1^m, et l'enasidenib, inhibant l'activité enzymatique d'IDH2^m. Bien que ces deux inhibiteurs donnent des résultats prometteurs, 60% des patients traités rechutent^{76,77}. Certains mécanismes de résistance ont déjà été mis en évidence, comme l'émergence de nouvelles mutations⁷⁸⁻⁸⁰, la présence et sélection de clones ne portant pas une mutation IDH⁸⁰, ou encore la reprogrammation métabolique vers un métabolisme mitochondrial, discuté ensuite⁸¹.

iii. Inhibiteurs de protéines anti-apoptotiques : Le Venetoclax, inhibiteur de la protéine mitochondriale anti-apoptotique BCL₂, surexprimée dans les LAM^{82,83}. Utilisé comme traitement alternatif chez les patients non éligibles pour une chimiothérapie intensive, il est combiné avec une faible dose d'AraC (LDAC) ou avec un agent hypométylant tel l'azacytidine (AZA). Un essai clinique étudiant la combinaison avec LDAC indique que 48% des patients adultes ont été en rémission complètes (vs. 13% pour les patients traités avec LDAC seulement)⁵⁵. Deux essais cliniques étudiant la combinaison avec AZA ont également obtenu de très bons résultats : Chez des patients âgés de plus de 75 ans, la rémission complète a doublé avec la combinaison (36.7% avec la combinaison et 17.9% avec AZA seul)⁵⁶ et chez des patients de plus de 60 ans, un taux de rémission complète de 71% a été atteint avec la combinaison⁵⁷. Venetoclax est donc devenu une molécule très prometteuse pour le traitement des patients ne pouvant supporter une chimiothérapie intensive. Malheureusement, bien que les taux de rémission augmentent et que la survie augmente en moyenne de 16 mois⁵⁷, les patients continuent de rechuter, à cause de la présence et émergence de CSL résistants⁸⁴⁻⁸⁶.

iv. Autres thérapies ciblées : Le glasdegib⁸⁷, inhibant la voie de signalisation de Hedgehog, a été approuvé en 2018 pour le traitement des LAM. Cette voie de signalisation régule la différenciation et l'autorenouvellement chez l'embryon, et a été démontrée comme suractivée dans les LAM et principalement les CSL⁸⁸. Ce traitement est utilisé en combinaison avec LDAC, chez les patients de plus de 75 ans qui ne sont pas éligibles pour une chimiothérapie intensive^{89,90}. L'essai clinique de phase II a pu montrer une réelle amélioration du pourcentage de rémissions complètes (2.6% pour le bras LDAC,

INTRODUCTION

17.9% pour le bras LDAC + Glasdegib)⁸⁹ et un essai en phase III le combinant à la chimiothérapie intensive est en cours⁹⁰.

Un autre traitement ciblant les CSL est une thérapie ciblée anti-CD33 : le gemtuzumab ozogamicin. Ce marqueur de surface se retrouve dans 88% des patients⁹¹. L'anticorps anti-CD33 est couplé avec un agent anti cancéreux, la calicheamicin, qui est relâché dans la cellule lorsque l'anticorps est internalisé⁹². Des essais cliniques en phase III ont permis d'augmenter de façon significative la survie des patients de moins de 18 ans⁹³ et d'atteindre 30% de rémission, complète ou incomplète, chez des patients de plus de 61 ans, inéligibles pour un autre traitement⁹⁴

Enfin, une nouvelle formulation de la combinaison 7+3 a été approuvée. Le CPX-351, formulation liposomale de l'AraC et de la daunorubicine, a permis d'augmenter l'efficacité et la spécificité de ce traitement⁹⁵. Ces deux molécules peuvent avoir des effets antagonistes sur les cellules leucémiques. Il est donc nécessaire de maintenir un ratio fixe de ces deux molécules afin d'obtenir le résultat optimal (AraC:daunorubicine, 5:1)⁹⁶. Cette nouvelle formulation permet une distribution des drogues contrôlée et plus étalée dans le temps. Ceci a permis d'augmenter les cas de rémission complète de 33% à presque 50% dans un essai clinique sur patients âgés de 60 à 75 ans⁹⁷.

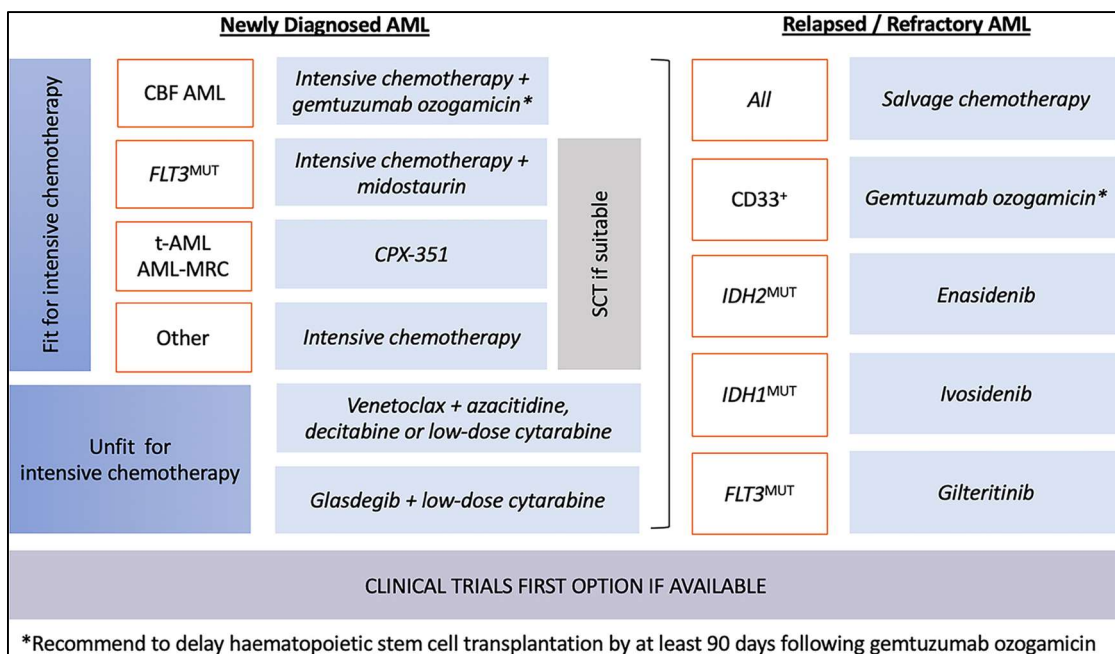


Figure 7. Schéma thérapeutique actuel des LAM.

(CBF, core-binding factor; MRC, évolution d'une myélodysplasie ; SCT, allogreffe) (Tiong & Wei⁹⁸)

Mécanismes de résistance thérapeutique

Les mécanismes de résistance des LAM aux traitements se regroupent en deux catégories : Les **résistances primaires**, qui sont présentes avant le traitement et permettent la tolérance à la thérapie, et les **résistances secondaires**, acquises suite au traitement par les cellules résiduelles et permettant l'adaptation.

Un phénomène central contribuant à ces deux catégories de résistance est l'**hétérogénéité clonale** des blastes leucémiques⁹⁹. Des mutations génétiques s'accumulent dans différents clones leucémiques qui peuvent coexister chez un même patient. Durant et suivant une thérapie, deux mécanismes se mettent en place. Tout d'abord, les clones résistants au traitement pourront proliférer au détriment des clones sensibles, changeant les caractéristiques mutationnelles du patient. Ensuite, des clones portant de nouvelles mutations conférant un avantage de prolifération et de résistance peuvent apparaître et recoloniser le patient. Des gènes comme Wilms tumor (WT1), les protéines RAS ou encore FLT3 peuvent acquérir des mutations qui favorisent la prolifération cellulaire et l'échappement aux traitements¹⁰⁰. La présence initiale de clones résistants et l'apparition de nouveaux clones sont respectivement des cas de résistance primaire et secondaire (**Figure 8**). L'hétérogénéité clonale intervient dans la résistance à de nombreux traitements, notamment l'AraC¹⁰¹, les inhibiteurs de FLT3^m^{102,103} et de IDH^m^{80,103}, mais aussi de Venetoclax, même si cela a été à ce jour étudié dans les leucémies chroniques lymphocytiques et non les LAM pour ce dernier traitement¹⁰⁴. L'hétérogénéité clonale est donc un **mécanisme universel** de résistance. Pour répondre à cela, un suivi constant du patient et de l'évolution de sa maladie sont nécessaires afin d'adapter les traitements.

D'autres mécanismes de résistance non génétiques communs à de nombreux traitements existent¹⁰⁰. Par exemple, **la présence de CSL entraîne très souvent la rechute des patients**^{105,106}. Ces cellules, rares et quiescentes par nature, sont rarement affectées par la plupart des drogues utilisées. Lorsque le patient atteint la rémission, les CSL résiduelles, souvent indétectables et caractérisées par une signature génique particulière¹⁰⁷, ont alors la capacité de proliférer et reconstituer la maladie. Ces cellules sont transitoires : elles émergent suite à une chimiothérapie afin de régénérer la maladie¹⁰⁷. Ensuite, les cellules leucémiques expriment des **pompes d'efflux**, des protéines responsables de l'export de xénobiotiques comme les principes actifs des traitements¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Un exemple de ces protéines est la glycoprotéine P, surexprimée dans les LAM et de mauvais pronostic¹⁰⁹. De plus, **l'altération des microARN** est impliquée également dans la résistance. Les microARN sont de petits ARN ne codant pas de protéines et régulant de nombreux processus cellulaires comme l'expression génique, la prolifération et division cellulaire. Dans les LAM, de nombreux microARN ont été associés à la réparation de l'ADN suite aux dommages causés par les traitements¹¹¹, à la régulation du cycle cellulaire^{112,113} et l'inhibition de l'apoptose induite par les thérapies¹¹⁴. Enfin, la **reprogrammation du**

INTRODUCTION

métabolisme cellulaire permet également la résistance à de nombreux traitements (voir section « Flexibilité métabolique et résistance aux traitements » page 84).

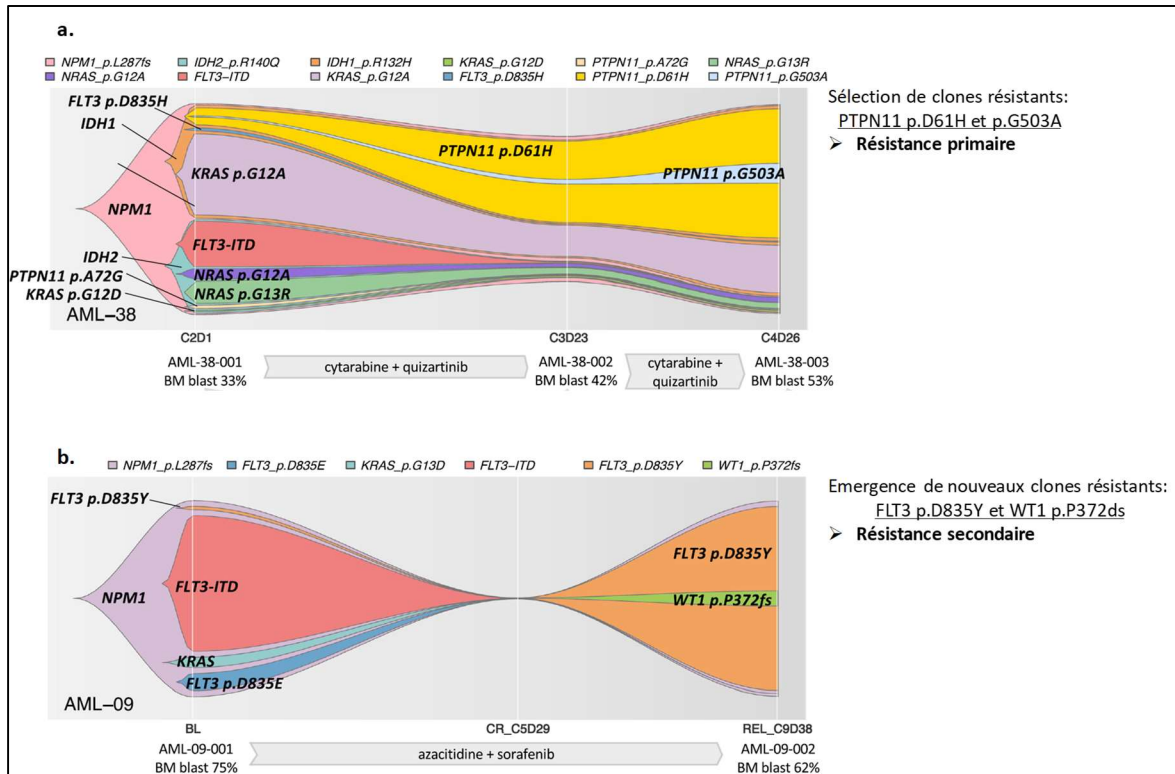


Figure 8. Exemple d'hétérogénéité clonale amenant à la résistance.

a. Exemple du suivi d'un patient réfractaire au traitement (AML-38). Au diagnostic (C2D1), le patient présentait 12 clones différents, dont certains ont été amplifiés suite à une combinaison d'AraC et de Quizartinib (C3D23 & C4D26)

b. Exemple du suivi d'un patient sensible ayant eu une rechute (AML-09). Au diagnostic (BL), le patient présentait 5 clones différents. A la rémission suite à une combinaison d'Azacytidine et de Sorafénib (C5D29), la maladie résiduelle était indétectable. A la rechute, de nouveaux clones ont émergés (Morita et al.¹⁰³).

EN BREF

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes sont des hémopathies très hétérogènes de par leur provenance et leur fond génétique. Ces dernières années, des efforts considérables ont été mis en œuvre afin de mieux caractériser ces cancers et proposer de nouveaux traitements adaptés. Malgré des améliorations concrètes du pronostic global, les patients réfractaires aux traitements ou présentant des rechutes restent très nombreux. Il est donc nécessaire de comprendre au mieux les mécanismes de leucémogénèse et de résistance aux traitements afin d'améliorer la prise en charge des patients et de proposer des combinaisons thérapeutiques encore plus efficaces.

INTRODUCTION

Métabolisme et LAM

Généralités

Organisation générale du métabolisme

Le métabolisme cellulaire désigne l'ensemble des transformations biochimiques ayant lieu au sein d'une cellule. Divisé en deux catégories, le catabolisme et l'anabolisme, celui-ci entre en jeu dans les mécanismes cellulaires, tels la prolifération cellulaire, le maintien d'une balance redox, ou encore la réponse aux stress du microenvironnement.

Le **catabolisme** prend en compte l'ensemble des réactions biochimiques qui ont pour finalité la dégradation des macromolécules et nutriments en molécules plus simples. Il est caractérisé par un ensemble de réactions dites oxydantes et thermodynamiquement favorables. L'énergie relâchée par ces réactions est transférée à des cofacteurs (i.e. $\text{NA(P)D}^+/\text{NA(P)DH}^+$, FAD/FADH_2 , $\text{AMP}/\text{ADP}/\text{ATP}$).

L'**anabolisme** prend en compte l'ensemble des réactions biochimiques qui ont pour but de synthétiser les molécules et macromolécules nécessaires à la production de biomasse et de stocks, et donc à la prolifération des cellules. Coûteuses en énergie, la plupart de ces réactions sont réductrices et nécessitent un apport en énergie, à travers des cofacteurs. Les produits principaux de l'anabolisme sont les polysaccharides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

Une dernière catégorie peut être décrite, lorsque l'on se place dans le référentiel des flux d'électrons : la dissémination. Une partie des réactions biochimiques transfère les électrons à des métabolites dits déchets, qui seront relâchés dans le milieu extracellulaire. On peut notamment penser à l'urée ou au lactate, même si ce dernier est de plus en plus considéré comme un métabolite stock d'électron qui permet l'échange d'énergie entre cellules^{115,116}.

Bien que complexe et très interconnecté, le métabolisme cellulaire peut se diviser en sous-parties appelées voies métaboliques (**Figure 9**). Les voies principales constituant le métabolisme central sont les suivantes :

- la **glycolyse** et **voie des pentoses phosphates**, permettant de dégrader le glucose pour alimenter le métabolisme énergétique et contribuer à la formation de précurseurs essentiels à l'anabolisme.
- le **cycle de Krebs**, qui permet la production de cofacteurs alimentant les oxydations phosphorylantes (OxPHOS). C'est une voie centrale du métabolisme, reliant catabolisme énergétique et anabolisme.
- la **dégradation des acides gras**, produisant de l'acétyl-CoA qui alimente le cycle de Krebs et la **synthèse des acides gras**, qui, à partir d'acétyl-CoA forme du palmitate puis la plupart des classes lipidiques.

INTRODUCTION

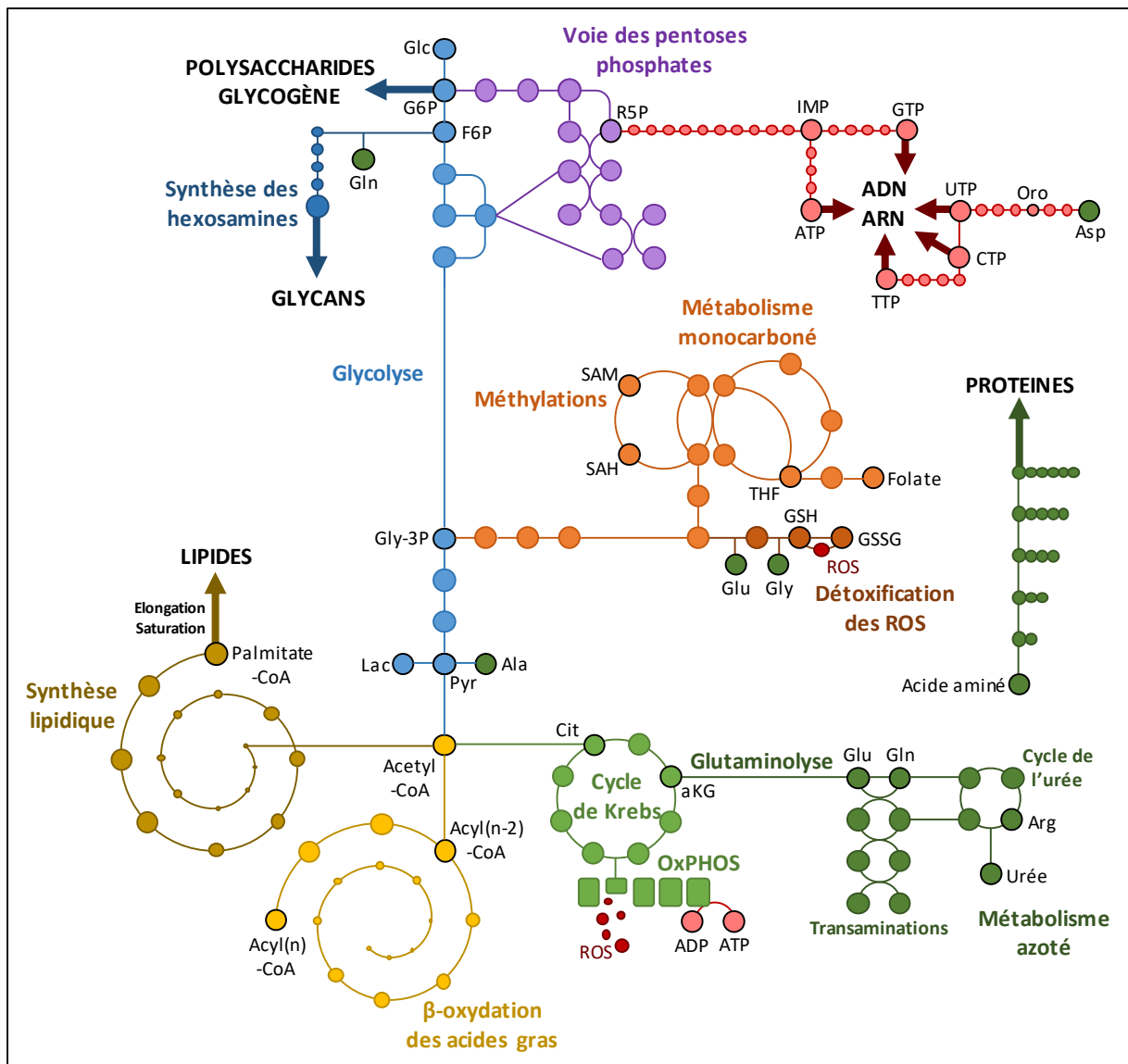


Figure 9. Voies métaboliques simplifiées.

Les principales voies du métabolisme, discutées ensuite sont la glycolyse (bleu clair), dont découlent la synthèse des hexosamines (bleu foncé) et la voie des pentoses phosphates (violet), la synthèse lipidique (jaune foncé) et la β -oxydation des acides gras (jaune clair), le cycle de Krebs (vert clair), le métabolisme azoté et la synthèse protéique (vert foncé), le métabolisme monocarboné (orange clair) et la synthèse de glutathion (orange foncé), et la synthèse des purines et pyrimidines (rouge). (Glc, glucose ; G6P, glucose-6-phosphate ; F6P, fructose-6-phosphate ; Gly-3P, 3-phosphoglycérate ; Pyr, pyruvate ; Lac, lactate ; Ala, alanine ; Gln, glutamine ; Cit, citrate ; aKG, α -cétoglutarate ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine triphosphate ; Glu, glutamate ; Arg, arginine ; R5P, ribose-5-phosphate ; IMP, inosine monophosphate ; GTP, guanosine triphosphate ; Asp, aspartate ; Oro, orotate ; UTP, uridine triphosphate ; CTP, cytidine triphosphate ; TTP, thymidine triphosphate ; THF, tétrahydrofolate ; SAM, S-adenosylméthionine ; SAH, S-adenosylhomocystéine ; Gly, glycine ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé)

- le **métabolisme monocarboné**, impliqué dans la **synthèse des nucléotides**, permettant la production du S-adenosylméthionine (SAM) nécessaire pour la méthylation des macromolécules, mais aussi de glutathion pour la régulation des ROS.

- la **glutaminolyse** et **métabolisme des acides aminés**, alimentant principalement la synthèse lipidique et le métabolisme énergétique. Les acides aminés alimentent en premier lieu la **synthèse protéique**, mais ils sont également impliqués dans de très nombreuses voies métaboliques comme, par exemple, la synthèse de glutathion, le **cycle de l'urée** et la synthèse des nucléotides.

Le métabolisme dans les cancers

Les cellules cancéreuses ont de nombreuses caractéristiques qui leur permettent de proliférer, échapper au système immunitaire, métastaser, ou encore éviter la mort cellulaire. L'une de ces caractéristiques principales est la **dérégulation du métabolisme**, découverte pour la première fois par Otto Warburg, lorsqu'il a mis en évidence en 1927 que les cellules cancéreuses ont une fermentation lactique accrue, et ce même en présence d'O₂ abondant¹¹⁷. Ce phénomène est souvent appelé glycolyse aérobie. Même si quelques cancers ne possèdent pas cette caractéristique¹¹⁸, elle permet, entre autres, une prolifération augmentée et la production excessive de lactate acidifie le microenvironnement. Cela nuit aux cellules saines, modulant le microenvironnement à la faveur des cellules leucémiques. Le métabolisme est depuis devenu, dans les années 1990, un domaine au cœur des études sur le cancer (**Figure 10**). D'autres modulations du métabolisme communes aux cancers ont été découvertes¹¹⁹, comme la dérégulation du métabolisme lipidique¹²⁰, la modulation du métabolisme des acides aminés¹²¹, soutenant l'augmentation de la demande en azote et la prolifération¹²², ou l'altération de la régulation génique par des métabolites¹²³.

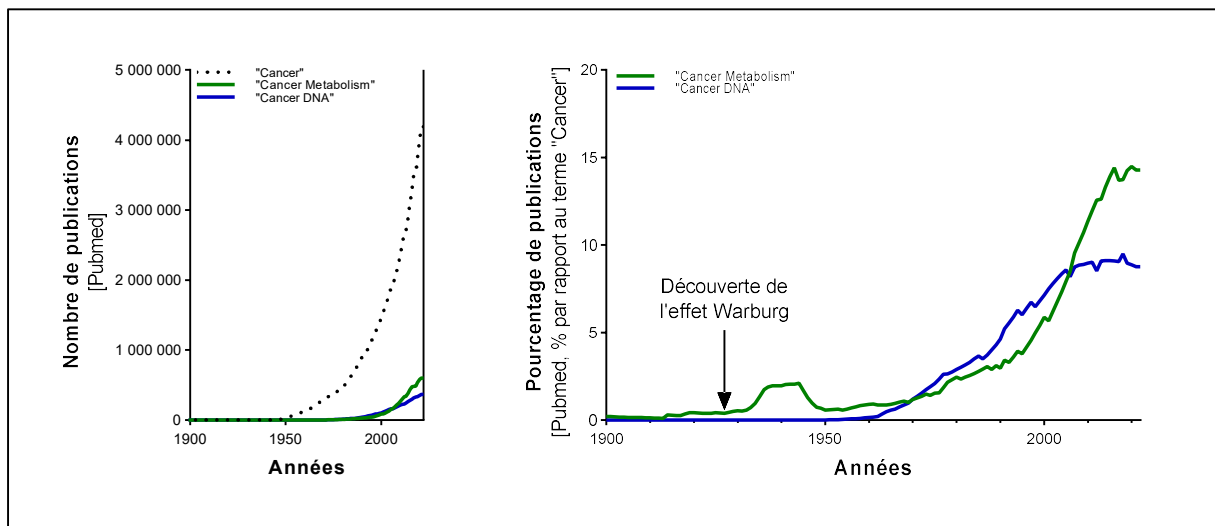


Figure 10. Publications sur le métabolisme des cancers.

Recherche des termes « Cancer », « Cancer Metabolism » et « Cancer DNA » sur Pubmed en Septembre 2021. a. nombre et b. pourcentage de publications associées au métabolisme du cancer. Les termes « Cancer DNA » ont été recherchés pour comparaison.

INTRODUCTION

La reprogrammation métabolique soutient les autres caractéristiques des cancers (**Figure 11**)¹²⁴. Par exemple, l'augmentation de l'activité glycolytique, combinée à une augmentation globale de l'activité anabolique est nécessaire à la **prolifération cellulaire** et à un **potentiel de réplication illimité**¹²⁵. L'augmentation de la fermentation lactique entraîne l'acidification et la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant ainsi l'**angiogenèse** et la **métastase**¹²⁶. Les cellules cancéreuses peuvent également **réprimer le système immunitaire**. L'acidification du microenvironnement empêche l'invasion des lymphocytes cytotoxiques T et favorise la migration des macrophages associés à la tumeur¹²⁶. Les cellules cancéreuses surexpriment également les enzymes du métabolisme des kynurénines à partir du tryptophane, métabolites immunosuppresseurs¹²⁷. Enfin, l'activité de la mitochondrie est affectée dans la plupart des cancers. Ceci entraîne aussi une **résistance à l'induction de l'apoptose** et donc une **résistance aux traitements**¹²⁸.

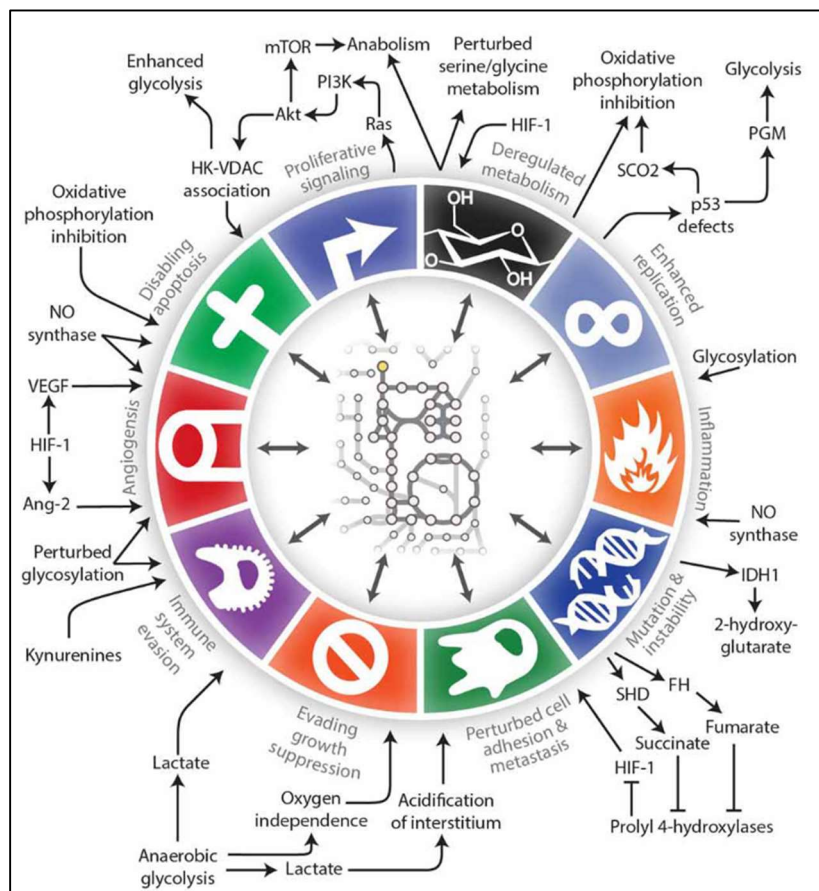


Figure 11. Connexions entre métabolisme et 'Hallmarks' du cancer.

(NO, oxide nitrique; VEGF, vascular endothelial growth factor; HIF, hypoxia-induced factor; Ang-2, angiopoietin; SHD, Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein D ; FH, fumarate hydratase; IDH1, isocitrate dehydrogenase 1; PGM, phosphoglucomutase; SCO2, cytochrome C oxidase assembly protein; Ras, rat sarcoma virus; PI3K, phosphoinositol 3-kinase ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; HK, hexokinase ; VDAC, voltage-dependent anion channel) (Lewis & Adbel-Haleem¹²⁹)

Les voies de signalisations cellulaires sont impliquées dans la régulation du métabolisme et donc dans la reprogrammation métabolique cancéreuse¹³⁰. Par exemple, les voies MAPK/ERK et PI3K/AKT permettent l'activation de mTOR, la régulation de la glycolyse et du métabolisme des acides aminés, et favorisent la prolifération¹³¹⁻¹³³. L'induction de la voie MAPK/ERK permet également l'augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance comme VEGF, qui soutiennent l'angiogenèse et la métastase¹³⁴. L'inactivation de p53, qui régule la glycolyse et est observée dans de nombreux cancers, permet la réplication illimitée¹³⁵. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIF) régulent la glycolyse et le métabolisme mitochondrial. Ils sont également impliqués dans la migration tumorale, l'angiogenèse et l'immunosuppression. Enfin, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites en grandes quantités par les mitochondries cancéreuses, activent des voies de signalisation comme NF-kB, MAPK/ERK et PI3K/AKT pour favoriser la prolifération¹³⁶.

La reprogrammation métabolique se définit par les changements observés dans le métabolisme d'une cellule entre deux conditions. Dans le cadre des cancers, de nombreuses reprogrammations sont étudiées : entre les cellules saines et cancéreuses, entre différents sous-groupes de patients, avant et après un traitement, au diagnostic et à la rechute. **Cependant, l'organisme humain est composé de nombreux organes, ayant chacun des spécialités et fonctions propres.** Par exemple, le foie produit la majorité du glucose de l'organisme, le rein permet l'excrétion des déchets métaboliques et les tissus adipeux accumulent les réserves de lipides¹³⁷. De ce fait, les profils métaboliques des différents tissus sont tous différents. L'utilisation des nutriments est également très hétérogène : Le cerveau consommera principalement du glucose, tandis que le foie utilisera les acides aminés plasmatiques pour alimenter la gluconéogenèse¹³⁷. A cela s'ajoute également de nombreux paramètres, comme l'état nutritionnel de l'organisme. Lorsque l'organisme est suffisamment nourri, les flux d'acides aminés se font des intestins aux autres organes. Au contraire, lorsque les nutriments sont rares, les muscles produisent des acides aminés principalement métabolisés par le foie et les reins pour produire du glucose, lequel est utilisé par les autres organes¹³⁸.

Il est ainsi difficile de parler de dérégulation métabolique des cancers sans prendre en compte le contexte dont proviennent les cellules cancéreuses et l'environnement dans lequel elles évoluent. Les reprogrammations métaboliques sont donc spécifiques à chaque cancer. Mon travail de thèse portant sur les cellules LAM, je traiterai dans la suite de cette introduction de la nature de la reprogrammation métabolique au cours du développement leucémique et de l'impact des thérapies sur le métabolisme des cellules de LAM et du rôle de celui-ci dans la réponse aux traitements.

INTRODUCTION

Métabolisme des LAM

Bien que cela ne soit pas encore entièrement décrit, l'hématopoïèse normale repose sur une série de reprogrammations métaboliques, permettant à la fois le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et la production en masse des cellules sanguines. Les cellules hématopoïétiques possèdent ainsi une flexibilité métabolique qu'elles semblent conserver au cours d'événements mutagènes¹³⁹. De nombreuses études et revues ont été publiées au cours des dernières décennies concernant le métabolisme spécifique des LAM¹⁴⁰ et le lien entre métabolisme et résistance aux traitements dans ces cancers¹⁴¹⁻¹⁴³. La biosynthèse des macromolécules nécessaires à la prolifération et la reprogrammation de l'utilisation des nutriments afin de soutenir l'augmentation du métabolisme mitochondrial sont les principaux axes de reprogrammation décrits.

La dépendance à la glycolyse

Comme dit précédemment, Otto Warburg et son équipe avaient démontré en 1927 la capacité des sarcomes du rat à détourner l'utilisation du pyruvate produit par la glycolyse de son utilisation dans le cycle de Krebs¹¹⁷. Cette caractéristique est typique des cellules prolifératives¹⁴⁴ et a ensuite été étendue à de nombreux autres cancers, dont les LAM, et la reprogrammation du métabolisme cellulaire est aujourd'hui considérée comme un des 'hallmarks', ou caractéristique, des cancers¹⁴⁵.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour comprendre cette reprogrammation qui, au premier abord, ne semble pas à l'avantage de la cellule. En effet, la glycolyse ne permet la production que de 2 molécules d'ATP, contre 36 lorsque le pyruvate est utilisé dans la respiration mitochondriale¹⁴⁶. Une des premières explications proposées est que, en cas d'abondance de glucose, la fermentation lactique conduit à une production plus rapide d'ATP que l'utilisation mitochondriale du pyruvate¹⁴⁷. Ceci est notamment dû au fait que le transport du pyruvate dans la mitochondrie est une étape limitante¹⁴⁸. Cela est exacerbé dans les cellules cancéreuses, puisque le transporteur de pyruvate dans la mitochondrie est moins efficace que dans des cellules saines¹⁴⁹. Cependant, il a été démontré dans de nombreux cancers que la mitochondrie était responsable de la production de la majorité du pool d'ATP¹⁵⁰, malgré l'activation de la fermentation lactique. Il a tout d'abord été pensé que la glycolyse permettait la formation des précurseurs de l'anabolisme. Le fait que les acides aminés totaux contribuent principalement et de façon plus importante au glucose à la formation de biomasse¹⁵¹ a remis en cause cette théorie. La transformation du pyruvate en lactate permet cependant la régénération du NADH produit par la glycolyse en NAD⁺, cofacteur essentiel de l'anabolisme¹⁴⁴. Bien que la chaîne de transfert d'électrons (ETC), ou chaîne respiratoire, régénère aussi ce cofacteur, l'efficacité de production de NAD⁺ par les ETC est dépendante de la production d'ATP par l'ATP synthase, ou complexe V. Ainsi, pour des cellules nécessitant des pools élevés d'ATP et de NAD⁺, la production de NAD⁺ par la fermentation du glucose en lactate découplée de la production d'ATP

INTRODUCTION

mitochondriale est préférée¹⁵². Une augmentation de l'activité glycolytique est donc cruciale pour les cellules en prolifération, donc pour les cancers.

Les LAM dépendent elles aussi grandement de l'utilisation du glucose. Le PET-SCAN, technique de diagnostic se basant sur la consommation de glucose marqué au ¹⁸F des cellules cancéreuses, est utilisée pour localiser les tumeurs leucémiques¹⁵³. La surexpression du transporteur de glucose SLC2A1, ou GLUT1, est associée à la rechute des patients¹⁵⁴ et les cellules primaires ayant une fermentation lactique élevée sont plus résistantes aux traitements différenciant tels que l'acide transrétinoïque (ATRA)¹⁵⁵. La glycolyse a donc un rôle majeur dans les cellules LAM (**Figure 12**).

La glycolyse se déroule dans le cytosol. Elle est régulée par de nombreux facteurs, dont la voie de signalisation PI3K/AKT. Cette voie de signalisation activée par mTOR¹⁵⁶ régule l'expression de l'hexokinase 2 (HK2) et de certains gènes de la PPP¹⁵⁷. Cette voie de signalisation est activée à l'état basal chez les patients atteints de LAM, les rendant sensibles aux inhibiteurs de cette voie tels que l'inhibiteur de PI3K : NVP-BKM120¹⁵⁸. PI3K est elle-même activée par FLT3. Des cellules portant une mutation activatrice de FLT3 résistantes aux inhibiteurs de la mutation montrent une expression accrue d'HK2 et une sensibilité plus importante aux inhibiteurs de la glycolyse tels que le 2-deoxyglucose (2-DG) ou le 3-bromopyruvate (3-BP), indiquant une dépendance plus importante à la glycolyse¹⁵⁹. De plus, HK2 est une protéine substrat de l'autophagie médiée par les chaperons (CMA)¹⁶⁰. L'activation de la CMA, notamment par l'inhibition de FLT3, entraîne la dégradation de HK2 et induit une activation de l'apoptose des cellules leucémiques¹⁶⁰. Ceci souligne une fois de plus le rôle particulier de la glycolyse pour la survie des cellules LAM. Le produit de HK2, le glucose-6-phosphate (G6P), peut être le substrat de la G6P-déshydrogénase (G6PD), première enzyme de la PPP. Les gènes de la PPP sont surexprimés dans 60% des LAM¹⁶¹, et cibler pharmacologiquement la G6PD dans ces cellules avec le 6-aminonicotinamide (6AN) entraîne une baisse de la prolifération cellulaire et de la migration^{161,162}. Le rôle de la signalisation mTOR dans ce phénotype a été mis en évidence à travers une flexibilité métabolique accrue, puisqu'une inhibition simultanée de mTORC1 et de G6PD entraîne une augmentation de l'activité du métabolisme énergétique mitochondrial¹⁶².

Les cellules de l'hématopoïèse normale ont une capacité de reprogrammation de l'utilisation du pyruvate assez importante, afin d'entrer en différenciation et de produire les cellules matures du sang. Les CSH réduisent préférentiellement le pyruvate en lactate. Cela permet le maintien de leurs capacités souches (e.g. autorenouvellement et quiescence). En effet, les pyruvate déshydrogénase kinases (PDK) activent la pyruvate déshydrogénase (PDH), favorisant l'utilisation mitochondriale du pyruvate. Inhiber PDK2 et PDK4 entraîne une perte des capacités souches des CSH, tandis que leur surexpression permet de les régénérer²⁰. De même, l'inhibition de PTPMT1, protéine régulant l'intégrité de la membrane des

organelles et essentielle pour le transfert du pyruvate dans la mitochondrie, conduit à une perte de capacité de différenciation des CSH dans des modèles murins²⁸. Enfin, l'invalidation génétique de la lactate déshydrogénase (LDHA), enzyme permettant la conversion du pyruvate en lactate, affecte la transplantation de cellules hématopoïétiques saines dans des modèles murins¹⁶³, montrant la dépendance des CSH à l'utilisation préférentielle du pyruvate pour former du lactate. **L'entrée en différenciation des CSH dépend ainsi de la reprogrammation de l'utilisation du pyruvate, au bénéfice du métabolisme mitochondrial (Figure 12).**

Cette capacité de reprogrammation, présente dans l'hématopoïèse normale, semble aussi se retrouver dans les cellules leucémiques, puisque l'extinction génique de LDHA dans les cellules leucémiques inhibe également la prise en greffe dans les modèles murins¹⁶³. Les auteurs ont lié cela à une redirection du pyruvate vers l'activité mitochondriale, accompagnée d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales trop importante, qui inhibent les capacités souches des cellules leucémiques. Un taux élevé de LDH dans le sérum des patients est également un facteur pronostic d'une rechute post traitement à l'AraC et au mitoxantrone^{164,165}. Ceci suggère que **les cellules leucémiques reposent sur la glycolyse pour proliférer, mais sont capables de reprogrammer l'utilisation du pyruvate pour résister efficacement aux traitements.**

Les essais cliniques ciblant cette voie métabolique restent peu nombreux et peu concluants (NCT01074086, NCT02438761), puisque les traitements proposés n'améliorent pas la réponse des patients, ou sont accompagnés d'effets secondaires trop importants. Bien que la glycolyse soit une voie métabolique activée de façon prononcée dans les LAM, la cibler directement affecte trop les cellules saines qui en dépendent également. De récentes études ouvrent cependant la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques dans la glycolyse. Par exemple, il a été récemment découvert que le métabolisme du fructose était impliqué dans la résistance au ciblage de l'utilisation du glucose commence à être étudié dans les cancers. Le fructose est aujourd'hui un sucre prévalent dans nos alimentations, notamment les sodas. Celui-ci peut entrer dans la glycolyse après phosphorylation en C1 par la kétohexokinase (KHK) et formation de glycérone-phosphate¹⁶⁶. En absence de glucose, les cellules leucémiques surexpriment le transporteur de fructose GLUT5¹⁶⁷. Le fructose peut alors être phosphorylé par les HK^{168,169}. Le métabolite alors produit est du fructose-6-phosphate (F6P) et non du glucose-6-phosphate (G6P), lequel inhibe les HK. Dégrader préférentiellement du fructose à la place du glucose permet donc d'éviter un frein naturel de la glycolyse, favorisant ainsi la prolifération cellulaire. Le fructose peut également être utilisé à l'état basal, lorsque GLUT5 n'est pas fortement exprimé. Celui-ci alimente alors la production de sérine¹⁶⁹ et permet l'anabolisme. Enfin, d'autres sources carbonées peuvent être utilisées par les cellules leucémiques pour résister à l'inhibition de la glycolyse, tel que les acides aminés ou les acides gras.

INTRODUCTION

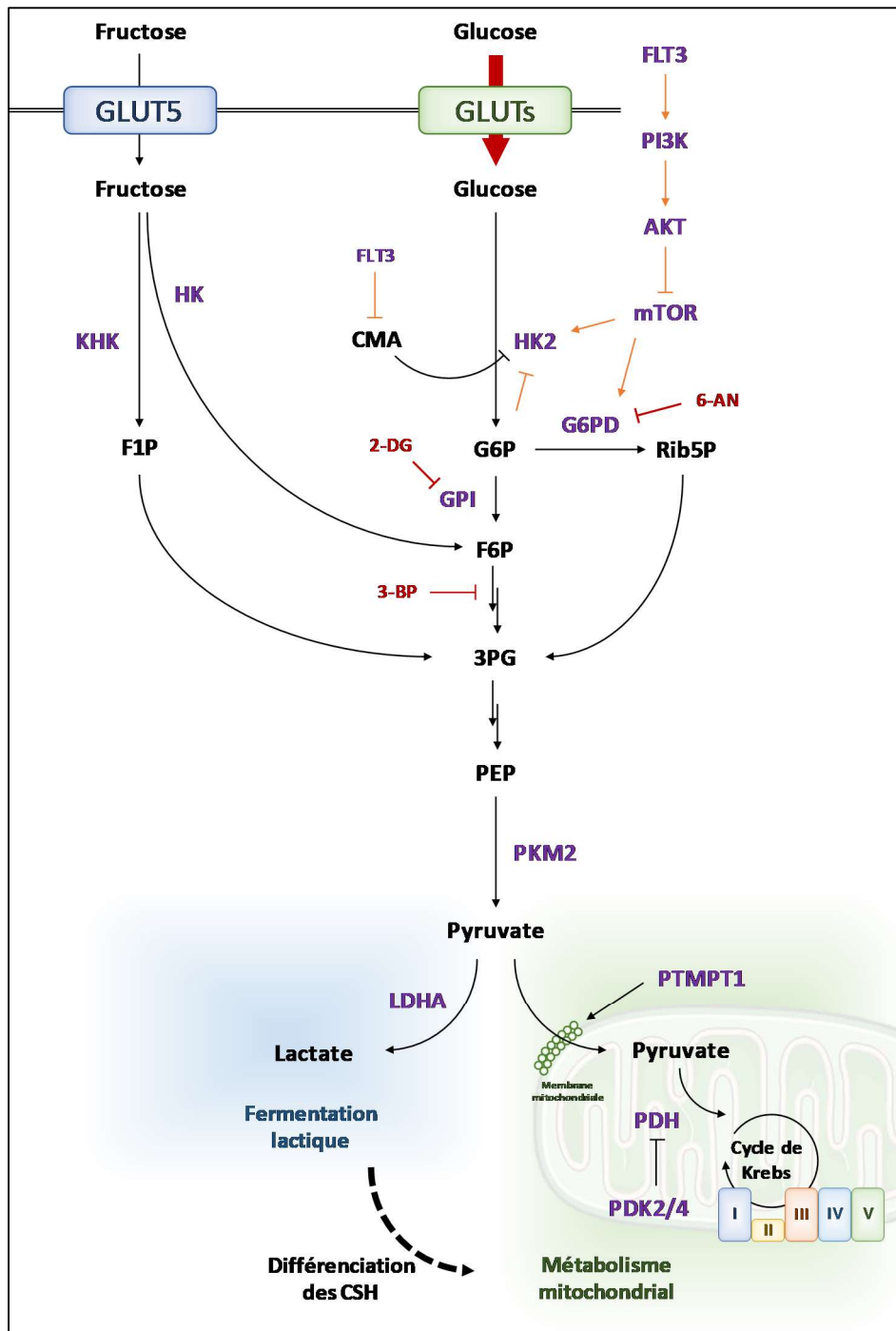


Figure 12. La glycolyse dans les LAM.

(G6PD, glucose-6-phosphate déshydrogénase ; 6-AN, 6-aminonicotinamide ; Rib5P, ribose-5-phosphate ; CMA, chaperone-mediated autophagy ; 2-DG, 2-déoxyglucose ; 3-BP, 3-bromo pyruvate ; GLUT, glucose transporter ; HK, hexokinase ; KHK, ketohexokinase ; F1P, fructose-1-phosphate ; G6P, glucose-6-phosphate ; F6P, fructose-6-phosphate ; 3PG, 3-phosphoglycérate ; PEP, phosphoenolpyruvate ; PKM2, pyruvate kinase muscle 2 ; LDHA, lactate dehydrogenase A ; PTMPT1 ; mitochondriale phosphatase ; CSH, cellule souche leucémique ; PDH, pyruvate dehydrogenase ; PDK, PDH kinase)

EN BREF

La glycolyse, cruciale pour les cellules cancéreuses en général, joue un rôle majeur dans le devenir des cellules souches et l'hématopoïèse, ainsi que dans les LAM. Bien que de nombreux essais de ciblage de la glycolyse aient échoué en clinique, des études récentes ont mis en évidence des mécanismes complexes de reprogrammation métabolique, permettant aux cellules cancéreuses de s'adapter. Ces travaux ont ainsi permis de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles associées à la dépendance glycolytique des cellules LAM.

INTRODUCTION

Le métabolisme des acides aminés

Plusieurs acides aminés (AA) ont été montrés d'une importance majeure au sein des cancers¹⁷⁰ et plus particulièrement dans les LAM^{140,143} (**Figure 13**). Sources carbonées et azotées, ils sont les composants de base des protéines et interviennent dans la plupart des voies métaboliques. Dans les LAM, la dérégulation du métabolisme des acides aminés a été suggérée en 1999 lorsque Muscaritoli *et al.* ont observé une accumulation de glutamate, de glycine, d'ornithine et de tryptophane libre dans le plasma des patients LAM, associée avec une déplétion en aspartate, méthionine, sérine et taurine¹⁷¹. Depuis, de nombreuses études ont été publiées sur le sujet. Notamment, les déprivations en cystéine, arginine et glutamine sont cytotoxiques pour les CSL dans les LAM⁸⁵. De plus, les CSL isolées à partir du sang de patients atteints de LAM consomment plus d'acides aminés, en particulier pour maintenir les phosphorylations oxydantes⁸⁴. Dans cette étude, les auteurs montrent notamment que les CSLs de patients au diagnostic traitées avec une combinaison de venetoclax (VEN) et d'azacytidine (AZA) ont des taux d'AA intracellulaires plus bas ainsi que des vitesses de consommation d'AA et d'oxygène diminuées. Par contre, lorsque ces mêmes CSL de patients LAM au diagnostic sont traitées avec VEN+AZA dans un milieu contenant 10 fois plus d'AA que le sérum humain, cela reverse l'apoptose et la diminution de consommation d'oxygène observées, démontrant que ces CSLs utilisent les AA pour alimenter le métabolisme mitochondrial et l'OxPHOS⁸⁴. Ces résultats démontrent ainsi que l'utilisation des acides aminés est non seulement essentielle pour la prolifération des cellules LAM, en particulier des CSLs mais aussi qu'elle joue un rôle clé dans leur réponse aux traitements.

L'AA principalement impliqué et étudié dans les reprogrammations métaboliques de la plupart des cancers est la glutamine (GLN)¹⁷², et particulièrement dans les LAM, puisqu'il est la source d'alimentation principale, avec le glucose et les acides gras, du cycle de Krebs¹⁷³. Les taux de GLN dans le plasma des patients atteints de LAM sont diminués par rapport aux patients sains¹⁷⁴. Les mécanismes dans lesquels est impliqué la GLN sont nombreux et la plupart d'entre eux sont modulés dans les LAM. Tout d'abord, la GLN est transformée en glutamate (GLU), par la glutaminase (GLS), pour alimenter plusieurs voies métaboliques, ce que l'on appelle la glutaminolyse. Cette enzyme est surexprimée chez les patients atteints de LAM¹⁷⁵. Le GLU peut alors entrer dans le cycle de Krebs pour **alimenter le métabolisme énergétique** sous forme d'aKG. Cibler le transporteur de la GLN, SLC1A5^{176,177}, ou la GLS à l'aide de son inhibiteur CB-839^{178,179} diminue l'activité du cycle de Krebs et le métabolisme mitochondrial, entraînant une diminution de la leucémogénèse et de la prolifération des blastes. Deux sous-groupes de patients sont particulièrement dépendants de cette glutaminolyse : les patients portants des mutations sur les gènes de FTL3 (FLT3^m) ou des IDH (IDH^m). Les combinaisons de CB-839 avec les inhibiteurs de ces mutations entraînent une mort accrue des cellules leucémiques mutées^{178,180-182}. Dans les LAM IDH^m, la GLN alimente aussi la production de l'oncométabolite 2-HG,

INTRODUCTION

produit à partir de l'aKG¹⁷⁵. Ensuite, la GLN est impliquée dans la **régulation des ROS**. En effet, le GLU formée à partir de la GLN est l'un des trois AA composant le glutathion (GSH) qui, du fait de son oxydation en GSSG, limite l'accumulation des ROS. Cibler le métabolisme de la GLN permet ainsi l'accumulation des ROS^{179,180,183} et la sensibilisation aux drogues générant des ROS tel que le trioxyde d'arsenic¹⁸³. De plus, la conversion de la GLN en GLU, puis du GLU en aKG, fait intervenir plusieurs transaminases, permettant la synthèse de nombreux AA. Ce rôle central dans le transfert des fonctions amines fait de la GLN un acteur majeur **du métabolisme azoté** dans la cellule. Ces fonctions permettent notamment la synthèse de nucléotides et d'hexosamines, impliqués dans la prolifération cellulaire et les voies de signalisation par glycosylation¹⁸⁴. Enfin, la GLN intracellulaire permet, grâce au transporteur SLC7A5, l'entrée d'acides aminés branchés activateurs de la signalisation mTOR, influant ainsi la **prolifération cellulaire** et le **devenir des nutriments**^{177,185}. Ainsi, la GLN est au centre de nombreux mécanismes cellulaires, nécessaires à la survie et la prolifération des cellules LAM.

De même que les patients LAM ont une déficience plasmatique en GLN, l'arginine (ARG) est également présente en quantités réduites dans les plasmas de patients LAM¹⁷⁴. Ce phénomène peut être expliqué par la dépendance des cellules LAM à l'ARG extracellulaire. En effet, la plupart des patients montre une sous-expression constitutive de l'argininosuccinate synthase 1 (ASS1), convertissant la citrulline et l'aspartate en précurseur de l'arginine (argininosuccinate)¹⁸⁶. Les cellules LAM, de par leur prolifération excessive, nécessitent une quantité importante de nutriments, contrairement aux cellules hématopoïétiques normales, et sont donc très dépendantes de l'apport en ARG extracellulaire, notamment pour la synthèse de nucléotides. Miraki-Moud *et al.* ont étudié l'effet de la déplétion en ARG extracellulaire. Pour cela, deux enzymes ont été utilisées : L'ARG déiminase (ADI), capable de dégrader l'ARG en citrulline, et l'argininase (ARGase), dégradant l'ARG en ornithine. En combinaison avec la cytarabine, cela a conduit à des effets anti-leucémiques *in vitro* et *in vivo*¹⁸⁶. Cette dépendance est actuellement exploitée dans plusieurs essais cliniques en cours, seules ou en combinaison avec VEN+AZA (NCT01910012, NCT05001828, NCT03455140)^{186,187}.

De même que les cellules de LAM sont en général déficientes en ASS1, il est connu que les cellules de leucémies aiguës lymphoblastiques, ou LAL, sont déficientes en asparagine synthétase (ASNS) et ne sont donc pas capables de synthétiser l'asparagine (ASN)¹⁸⁸. Cela a été le rationnel pour l'utilisation d'asparaginase (ASNase) afin de traiter ce type de leucémies¹⁸⁸. L'ASNase converti l'ASN en ASP, diminuant ainsi le pool extracellulaire d'ASN. Suite aux premiers essais positifs *ex vivo* des ASNases sur des échantillons primaires de patients atteints de LAM¹⁸⁹, des combinaisons de traitements conventionnels (AraC) avec l'ASNase ont été étudiées en essai clinique, montrant une augmentation de la survie des patients^{190,191}. Bien que les mécanismes d'action ne soient pas encore bien compris, quelques hypothèses ont été formulées dans d'autres cancers : Dans les glioblastomes, l'ASN permet

une inhibition du stress du réticulum endoplasmique induit par une accumulation de protéines mal conformées. Ceci permet l'inhibition de l'apoptose et l'évasion de la mort cellulaire¹⁹². L'ASN peut également, comme la GLN, être exportée afin d'importer d'autres AA, tel l'ARG qui active mTOR¹⁹³.

Les acides aminés branchés (BCAA) ont aussi un rôle majeur, qui commence à être étudié dans les LAM. Leur concentration est diminuée dans les plasmas de patients LAM¹⁷⁴, et l'enzyme BCAT1, la transaminase convertissant les BCAA en leur cétoacide complémentaire, est surexprimée dans les LAM et est de mauvais pronostic chez les patients atteints de LAM¹⁹⁴. De plus, la surexpression de BCAT1 observée dans les CSL par rapport aux cellules différenciées¹⁹⁵ épuise le pool d'aKG intracellulaire en le convertissant en GLU, diminuant l'activité des dioxygénases aKG-dépendantes, comme la famille d'ADN déméthylases TET. La surexpression de BCAT1 entraîne donc une hyperméthylation de l'ADN, similaire au phénotype caractéristique des cellules LAM du sous-groupe IDH^{m195}. L'inhibition de BCAT1 augmente ainsi le pool d'aKG, activant la dégradation du facteur d'hypoxie HIF1a, par l'action de la dioxygénase EGLN1, entraînant une diminution de la survie et de la prolifération des cellules leucémiques^{194,195}. Enfin, les BCAA jouent un rôle majeur dans la signalisation cellulaire et l'autophagie, puisque la leucine est un activateur de mTORC1¹⁸⁵, impliqué dans la détection des nutriments et la synthèse protéique¹⁷⁶.

La sérine (SER) a été démontrée cette année comme impliquée dans la résistance à l'AraC du sous-groupe des patients portant la mutation FLT3-ITD. Comme décrit précédemment, cette mutation permet l'activation constitutive de cette tyrosine kinase, qui active en cascade mTORC1 et le facteur de transcription impliqué dans la réponse aux stress ATF4. Ceci entraîne une surexpression de PHGDH et PSAT1, enzymes de synthèse de la SER, les transporteurs de sérine SLC1A4 et SLC1A5, ainsi que les enzymes du cycle des folates. La synthèse des purines est de ce fait augmentée, produisant ainsi les substrats nécessaires à la réparation de l'ADN endommagé par l'AraC. Les auteurs proposent ainsi une combinaison thérapeutique entre un inhibiteur de la PHGDH, le WQ-2101, et l'AraC, et démontrent un prolongement de la survie dans leurs modèles murins¹⁹⁶. D'autres études ont pu montrer l'activation de PKM2 par la SER et ont donc mis en évidence le lien entre la synthèse de SER et l'utilisation du glucose^{197,198}. Enfin, la SER hydroxyméthyltransférase (SHMT2), impliquée dans la synthèse des purines, permet le maintien de la balance oxydative dans un contexte hypoxique dans les neuroblastomes¹⁹⁹. La niche de la moelle osseuse étant très hypoxique et les LAM surexprimant SHMT2¹⁹⁹, il est possible que ce mécanisme se retrouve également dans cette leucémie.

La cystéine (CYS) est essentielle pour les CSL. Une déprivation des CSL en CYS entraîne une baisse de prolifération, une viabilité moindre et une leucémogénèse défectueuse⁸⁵. La CYS est métabolisée par les CSL pour synthétiser principalement du GSH, acteur de la régulation des ROS. Le GSH est aussi utilisé

INTRODUCTION

post-traductionnellement afin de protéger les résidus CYS labiles des protéines d'une oxydation délétère²⁰⁰. Une des protéines concernées par la S-glutathionylation est la succinate déshydrogénase A (SDHA), sous-unité du complexe II de l'ETC. Ainsi, une déprivation en CYS, ou un traitement épuisant les pools de CYS, la CYSase, impacte la synthèse de GSH, la glutathionylation de SDHA, et l'activité du complexe II de l'ETC, entraînant la mort des CSL. Ce mécanisme est spécifique des cellules leucémiques puisque les CSH ne sont pas sensibles à la CYSase⁸⁵. De plus, la première enzyme de synthèse du GSH a été décrite comme une cible spécifique des LAM. La présence de la sous-unité catalytique de la GLU-CYS ligase (GCLC) est essentielle pour la survie des LAM et la leucémogénèse, sans que les CSH en soient affectés²⁰¹. Une des nouvelles combinaisons thérapeutiques, venetoclax + Azacytidine, permet le ciblage des AA, et donc de la CYS, montrant des résultats intéressants chez les patients^{56,84,85}. De même, le transporteur de cystéine xCT, ou SLC7A11, fait partie d'un groupe de 6 gènes d'une signature liée au pronostic des patients²⁰² et a été démontré comme surexprimé chez les patients en rechute à différentes drogues^{15,203,204}. La CYS a donc un rôle important dans le métabolisme des LAM qui peut être ciblé de nombreuses façons.

Récemment, un article a pu démontrer le rôle de la méthionine (MET) dans un sous-groupe de patients : les LAM avec réarrangement MLL, qui correspondent à 10% des cas diagnostiqués. La MET est un AA qui peut être condensé à une molécule d'ATP pour former le S-adenosyl-méthionine (SAM), cofacteur impliqué dans l'activité des enzymes méthylant l'ADN et les histones, dont l'histone méthyltransférase DOT1L, à l'origine de la leucémogénèse du réarrangement MLL. La carence en MET ou l'inhibition pharmacologique de la synthèse de SAM entraîne une réduction de l'activité de DOT1L, impactant la prolifération et la viabilité des cellules LAM-MLL²⁰⁵. La MET étant un substrat de la méthylation du génome, son métabolisme pourrait également être ciblé dans le sous-groupe des patients IDH^m. En effet, la production du 2-HG entraîne un profil d'ADN hyperméthylé, nécessitant un apport fort en MET. Bien qu'aucun travail n'ait été publié dans les LAM IDH^m, l'utilisation accrue de MET par les glioblastomes IDH^m est connue. En effet, il y a une différence d'import de la MET entre les glioblastomes portant la mutation et ceux ne la portant pas, qui permet le diagnostic par imagerie PET de la ¹¹C-MET²⁰⁶.

Dans les leucémies érythroblastiques (groupe M6 de la classification FAB), dont l'incidence est de 5% des cas diagnostiqués, le métabolisme de l'histidine (HIS) est impliqué dans la résistance au methotrexate. Ce traitement, utilisé principalement dans les LAM de l'enfant²⁰⁷, inhibe la dihydrofolate reductase (DHR), une enzyme du cycle des folates qui produit du tétrahydrofolate (THF). Les quantités de THF intracellulaires sont diminuées suite au traitement au methotrexate, impactant la production de nucléotides et induisant la mort cellulaire. Les cellules traitées au methotrexate sont donc très dépendantes des quantités résiduelles de THF qu'elles possèdent. Or, une enzyme du catabolisme de

l'HIS, la formimidoyltransférase cyclodéaminase (FTCD), a également pour substrat le THF. Son activité réduit donc les quantités extracellulaires de THF. La combinaison du methotrexate et d'un régime riche en HIS réduit ainsi de façon drastique le pool de THF, et augmente la survie de souris xénogreffées avec une lignée leucémique surexprimant FTCD²⁰⁸. La supplémentation en HIS des régimes des patients traités avec cette molécule permettrait donc l'amélioration des réponses au methotrexate. Les taux d'HIS sont également réduits de façon significative dans le plasma des patients atteints de LAM, quel que soit leur sous-groupe¹⁷⁴. Le traitement des patients nouvellement diagnostiqués avec le methotrexate pourrait ainsi être réévalué, en combinaison avec une diète riche en HIS.

Le tryptophane (TRP) est un acide aminé aromatique impliqué dans la synthèse d'hormones telles que la sérotonine. C'est aussi le premier précurseur de la synthèse des kynurénines, une famille de métabolites immunosuppresseurs²⁰⁹. La première étape de cette voie métabolique est catalysée par l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO1), surexprimée dans près de la moitié des patients étudiés^{210,211}. L'expression d'IDO1 est liée à une survie globale à 3 ans des patients de seulement 30%, contre 70% chez les patients ne l'exprimant pas²¹²⁻²¹⁴. IDO1 est impliqué dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺/CD25⁻ en lymphocytes T régulateurs CD4⁺/CD25⁺, cellules réprimant le système immunitaire²¹⁵. De façon assez intéressante, IDO n'est pas exprimée à l'état basal dans les cellules hématopoïétiques normales²¹⁰, et un inhibiteur d'IDO, le 1-méthyl-TRP, sensibilise les cellules primaires exprimant IDO à des traitements²¹¹. Enfin, des taux élevés de kynurénine dans le plasma des patients est de mauvais pronostic²¹⁶.

Ainsi, la plupart des AA sont impliqués dans les phénotypes de prolifération, d'adaptation, de réponse aux traitements et de suppression de l'immunité. De nombreux traitements proposent de cibler les pools d'AA extracellulaires, seuls ou en combinaison avec d'autres traitements, dans les LAM¹⁴³ et plus généralement dans les cancers¹²¹. Cependant, la déplétion de plusieurs acides aminés, dont les BCAA, les AA aromatiques ou l'ARG, entraîne un stress important dans les CSH²¹⁷. Les traitements ciblant donc les pools d'AA comme la GLNase^{176,181}, l'ARGase¹⁸⁶, l'ADI-PEG¹⁸⁶, l'ASNase^{190,191} ou la CYSase⁸⁵ pourraient ainsi avoir un effet néfaste sur les cellules saines et réduire les taux de réponse. La réponse au stress induite par ATF4, activé par la déplétion en AA, est également un déterminant connu de la réponse mitochondriale à de nombreux traitements des LAM^{81,218,219}, traité dans un paragraphe suivant. Au vue des études présentées ici, l'adaptation des régimes alimentaires pour cibler les besoins en AA présente donc un intérêt thérapeutique à explorer. Il sera cependant nécessaire de mieux caractériser les réponses au stress induites qui pourront diminuer les effets des régimes alimentaires, et les effets toxiques sur les cellules saines afin de proposer les combinaisons de traitements les plus efficaces pour les patients.

INTRODUCTION

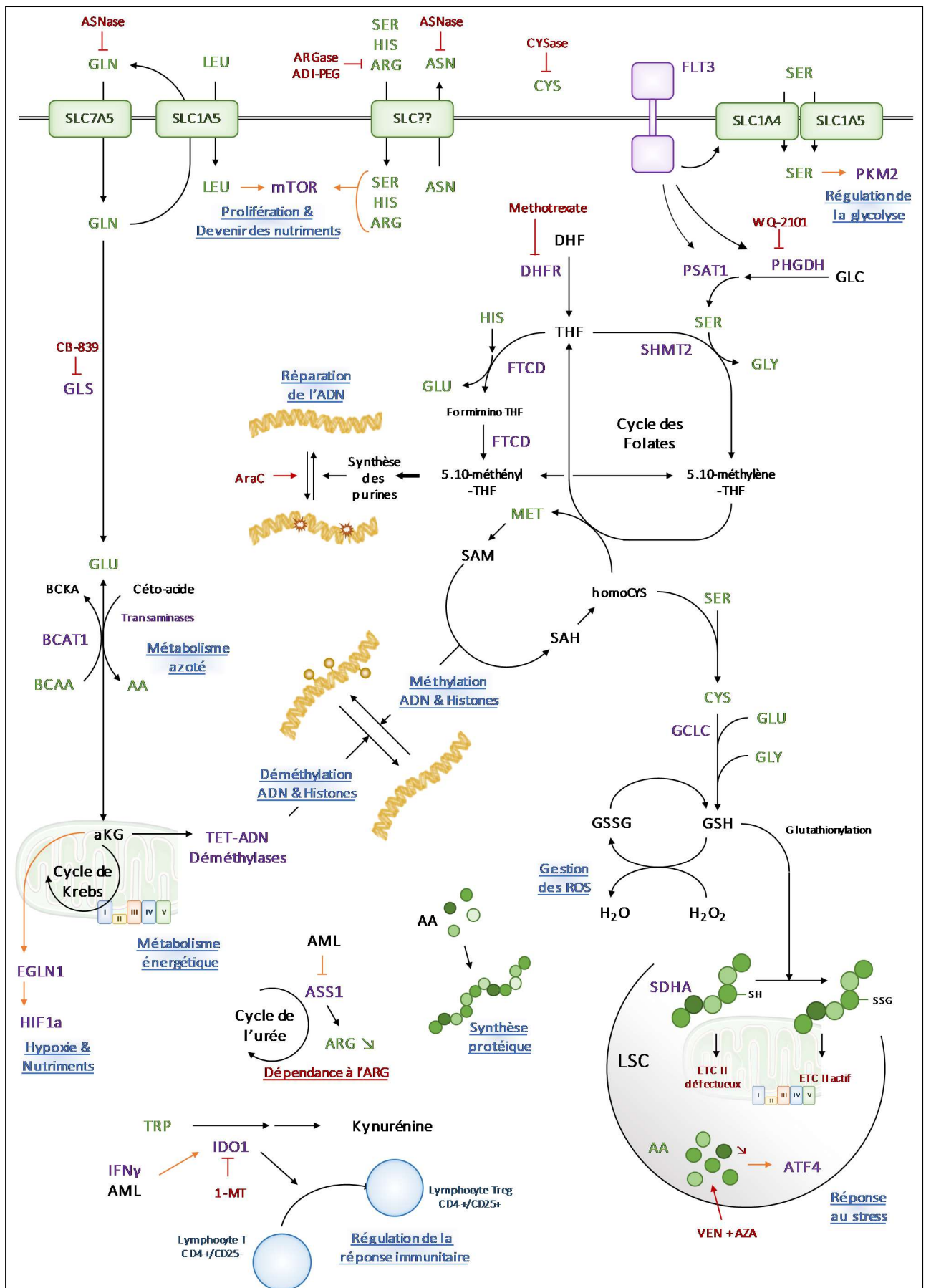


Figure 13. Métabolisme des acides aminés dans les LAM

(1-MT, 1-méthyltryptophane ; AA, acide aminée ; ADI-PEG, pegylated-arginine deaminase ; aKG, α -cétoglutarate ; ARG, arginine ; ARGase, argininase ; ASS, argininosuccinate synthase ; ASN, asparagine ; ASNase, asparaginase ; ATF4, activating transcription factor 4 ; BCAA, acide aminé branché ; BCAT, BCAA transaminase ; BCKA, cétoacide branché ; CD, cluster de différenciation ; CYS, cystéine ; CYSase, cysteinase ; DHF, dihydrofolate ; DHFR, DHF reductase ; GCLC, sous-unité catalytique de la glutamate-cystéine ligase ; GLU, glutamate ; GLN, glutamine ; GLS, glutaminase ; GLY, glycine ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; EGLN1, egl-9 family hypoxia inducible factor 1 ; ETC, chaîne respiratoire ; FLT3, fms-like tyrosine kinase 3 ; FTCD, formimidoyltransferase cyclodeaminase ; HIF, hypoxia-induced factor ; HIS, histidine ; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase ; LEU, leucine ; LSC, cellule souche leucémique ; MET, méthionine ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; PHGDH, phosphoglycerate dehydrogenase ; PKM2, pyruvate kinase muscle 2 ; PSAT1, phosphoserine aminotransferase ; SAH, S-adénosylhomocystéine ; SAM, S-adénosylméthionine ; SDHA, succinate dehydrogenase A ; SER, sérine ; SHMT2, serine hydroxymethyltransferase2 ; SLCx1y, solute carrier family x member y ; TET, ten-eleven translocation ; THF, tetrahydrofolate ; TRP, tryptophane ; VEN + AZA, venetoclax + azacytidine)

EN BREF

Les acides aminés sont impliqués dans de très nombreuses voies métaboliques et phénotypes cellulaires. Étant une des classes de métabolites les plus représentés dans le plasma et le contenu cellulaire, ils représentent une cible thérapeutique très intéressante. Les mécanismes de leur modulation dans les cellules LAM commencent à être bien connus et plusieurs thérapies les ciblant apparaissent, certaines conduisant à des essais cliniques actuellement en cours. Cependant, inhiber l'utilisation de ces AA peut conduire à l'activation de mécanismes de réponse au stress, néfastes pour les cellules saines. Approfondir le rôle de chacun et les mécanismes d'adaptation aux traitements proposés permettra d'optimiser la prise en charge des patients et de favoriser l'apparition de combinaisons d'agents thérapeutiques avec des diètes définies.

INTRODUCTION

Le métabolisme lipidique

Les lipides sont une classe de métabolites assez vaste. Dans les LAM, les concentrations cellulaires²²⁰ et plasmatiques^{221,222} des différentes classes lipidiques sont modulées par rapport aux patients sains. Ceci suggère une dépendance accrue des cellules LAM au métabolisme lipidique, en faisant une cible thérapeutique intéressante.

Dans cette partie, je décris principalement le rôle des **acides gras**. Le transporteur de carnitine localisé à la membrane plasmique, CT2, est surexprimé dans les LAM, ainsi que CPT1a, enzyme permettant le transport des acides gras dans la mitochondrie²²³. CPT1a a aussi été décrit comme facteur pronostic des LAM dans plusieurs études^{86,224,225}. Les acides gras sont la troisième source de nutriments respiratoires pour une cellule, avec les sucres et les acides aminés. Leur métabolisme se sépare en deux parties : leur catabolisme, dont la voie principale est la β -oxydation des acides gras (FAO), et leur anabolisme, ou synthèse des acides gras (FAS). Ces deux parties sont notamment régulées par la kinase AMPK qui inhibe par phosphorylation les deux acétyl-CoA carboxylases (ACC1 et ACC2)²²⁶. Ces deux enzymes catalysent la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA. La production de malonyl-CoA par ACC1, enzyme cytosolique, permet la FAS, tandis que le malonyl-CoA produit par ACC2, enzyme mitochondriale, inhibe CPT1a et donc la FAO. AMPK est donc un régulateur majeur de la reprogrammation entre FAS et FAO (**Figure 14**)²²⁷. Le métabolisme des acides gras est modulé dans l'hématopoïèse normale, puisque les CSH ont une FAO élevée, couplée à une activité importante d'AMPK²²⁸, alors que des cellules en différenciation plus avancée reposent principalement sur la FAS^{23,24}.

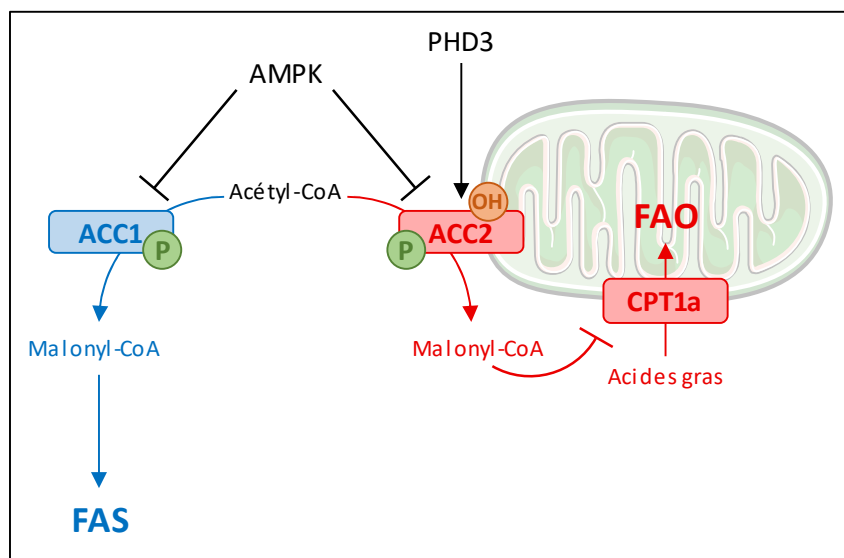


Figure 14. Régulation de la FAO et FAS par AMPK et PHD3.

AMPK inhibe les ACC en les phosphorylant, tandis que PHD3 active seulement ACC1 par hydroxylation

INTRODUCTION

Le catabolisme des acides gras, ou **FAO**, intervient dans la prolifération et la survie des LAM. Les CSL sont dépendantes de la FAO²²⁹. L'extinction génique de CT2 inhibe la prolifération cellulaire et la viabilité²²³. L'inhibition de VLCAD, une des enzymes permettant le catabolisme des acides gras à très longue chaîne, entraîne la mort leucémique sans effet notable sur l'hématopoïèse normale²³⁰, et l'utilisation d'avocatin B, inhibiteur de la FAO, entraîne la mort cellulaire, ainsi qu'une sensibilisation à l'AraC²³¹. ACC1 permet également la régulation de la prolifération leucémique. A travers l'action de certains oncogènes, tels que MLL-AF9, ACC1 est inhibée par la kinase AMPK et la FAO est activée, au détriment de la FAS²³². Cependant, l'anabolisme des acides gras, ou **FAS**, est aussi vital pour les LAM, notamment pour produire les phospholipides nécessaires à la formation des membranes cellulaires²³³. FASN, l'enzyme principale de la FAS, est surexprimée dans les LAM²³⁴. Dans les leucémies aiguës promyélocyaires (FAB M3), l'inhibition génétique ou pharmacologique de FASN entraîne une différenciation des cellules et une sensibilisation à l'agent différenciant ATRA²³⁴. De même, ALDH3A2, permettant la conversion des aldéhydes à longue chaîne aliphatique en acides gras, est spécifiquement nécessaire à la survie des LAM²³⁵. Ces aldéhydes proviennent des sources alimentaires ou de la peroxydation des acides gras en présence de ROS. Leur reconversion en acides gras promeut la FAS et inhibe la mort par ferroptose, discutée ensuite. Ainsi, à l'état basal, **le catabolisme et l'anabolisme des acides gras semblent de façon complémentaire être nécessaires à la prolifération des LAM**. Bien que cela semble contradictoire, puisque ces deux voies métaboliques sont inversement régulées par la phosphorylation des ACC par AMPK, une étude parue en 2016 a pu mettre en évidence l'hydroxylation activatrice spécifique d'ACC2 par PHD3, indépendante d'AMPK. Ainsi, dans des conditions où l'activité d'AMPK et de PHD3 sont réduites, ACC2 est inhibée par l'absence d'hydroxylation tandis que ACC1 est activée par l'absence de phosphorylation, permettant l'augmentation de l'activité respective de la FAO et la FAS (**Figure 14**). PHD3 étant sous-exprimée dans les LAM, les blastes leucémiques peuvent soutenir une augmentation simultanée de la FAO et de la FAS²³⁶.

Bien que les acides gras soient la famille de lipides la plus étudiée dans les LAM, d'autres classes ont des rôles intéressants. Les céramides et leurs précurseurs les sphingosines, interviennent de façon notable dans plusieurs cancers, dont les LAM. L'inhibition de SPHK1, enzyme surexprimée dans les LAM catalysant la phosphorylation de la sphingosine en sphingosine-1-phosphate, entraîne une apoptose des cellules leucémiques dépendante des caspases²³⁷. De même, la céramidase acide, surexprimée dans les LAM, entraîne la surexpression d'une protéine anti-apoptotique, MCL1 et une augmentation de la survie des cellules leucémiques. Le ciblage pharmacologique de cette enzyme permet l'accumulation des céramides et l'inhibition de MCL1, entraînant la mort par apoptose des LAM²³⁸.

L'implication du métabolisme lipidique dans les LAM ne se limite pas à la prolifération et à la survie cellulaire. Il intervient également dans plusieurs mécanismes de résistances aux traitements. Ainsi, la FAO, associée à la surexpression de CD36, transporteur de lipides, et la lipophagie, processus de recyclage des lipides intracellulaires^{239,240}, alimentent le métabolisme mitochondrial dans les cas de résistance à l'AraC^{218,223,229,237}, au Venetoclax^{85,86,86,225,229,237}, à la mitoxantrone²⁴¹, aux inhibiteurs de IDH^{m81,242} et de FLT3^{m182}. De même, la FAS est aussi impliquée dans les mécanismes de résistance à l'agent différenciant acide trans-rétinoïque ATRA²³⁴ et aux inhibiteurs de IDH^{m81,242}. Dans le cas des résistances aux inhibiteurs de FLT3-ITD, le palmitate joue un rôle découplé de son métabolisme. En effet, la localisation de FLT3-ITD à la membrane plasmique, permet l'activation des voies de signalisation AKT et ERK, et favorise ainsi la survie cellulaire²⁴³. Une étude publiée cette année a pu démontrer que la palmitoylation, modification post-traductionnelle conjuguant une cystéine protéique avec un palmitate, de FLT3-ITD régulait sa localisation dans la cellule²⁴⁴. Ainsi, cibler pharmacologiquement la dépalmitoylation de FLT3-ITD sensibilise cette sous-population aux inhibiteurs de FLT3^m.

Enfin, les lipides sont impliqués dans un type de mort cellulaire découvert récemment : la **ferroptose**²⁴⁵. Cette mort cellulaire est initiée par une accumulation importante de ROS, suite à une accumulation de fer intracellulaire et un système de détoxification des ROS défectueux. Les ROS accumulés peroxydent les phospholipides membranaires et les membranes de la cellule sont alors endommagées. Quelques équipes proposent de cibler cette mort, assez rare dans une cellule saine, dans les cancers^{246,247}. Dans les LAM, un traitement permettant l'activation de p53, APR-246, induit la ferroptose, même si quelques mécanismes de résistances sont connus, dont la surexpression du transporteur de cystine xCT²⁰⁴. Une étude encore non publiée de mon équipe suggère également que les inhibiteurs de FLT3^m augmentent les taux d'une classe lipidique, les acides gras polyinsaturés, ainsi que les ROS, sensibilisant les cellules FLT3^m à des inducteurs de la ferroptose (*Sabatier et al.*, en préparation).

EN BREF

Le rôle des lipides dans le métabolisme des LAM commence à être élucidé. Leur synthèse permet la production de biomasse et de membranes cellulaires et favorise la prolifération cellulaire. Leur catabolisme est une source supplémentaire du métabolisme énergétique, vital pour la résistance à de nombreux traitements.

INTRODUCTION

Le métabolisme mitochondrial

Au centre de plusieurs voies métaboliques, la mitochondrie est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, tel que la **survie**, la **prolifération**, et l'**apoptose**. La mitochondrie est une organelle d'intérêt majeur dans les LAM, puisque de nombreuses études ont montré que **son activité est augmentée dans les cellules leucémiques**. La masse mitochondriale est également plus importante dans les cellules de patients²⁴⁸⁻²⁵⁰, tout comme les quantités d'ADN mitochondrial^{249,251}, le potentiel de membrane mitochondrial²⁴⁹, généré par l'activité des complexes de l'ETC et permettant la synthèse d'ATP par l'ATP synthase, et les ROS mitochondriaux²⁴⁹. Cependant, l'activité des ETC et la capacité respiratoire est réduite par rapport aux cellules saines^{248,250}, montrant que les cellules leucémiques ont donc une dépendance mitochondriale très élevée par rapport aux cellules de l'hématopoïèse normale. De plus, les patients atteints de LAM présentent fréquemment des mutations du génome mitochondrial^{252,253}, liées à un pronostic aggravé²⁵⁴. Bien que cela n'ait pas été étudié dans les LAM, des travaux effectués dans des cancers solides ont pu mettre en évidence que les mutations des gènes de l'ETC entraînent une activité défectueuse de la chaîne respiratoire qui augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS, discutés ensuite, favorisent la prolifération et la métastase de ces cancers^{255,256}. L'activité mitochondriale est donc une cible thérapeutique intéressante dans les LAM, mais aussi dans de nombreux autres cancers²⁵⁷.

Le maintien de la **masse mitochondriale** nécessite une machinerie de synthèse. Une partie des protéines formant les complexes de la chaîne respiratoire sont traduites à partir d'ADN mitochondrial. Ainsi, l'inhibition de la synthèse de cet ADN mitochondrial par la 2'3'-dideoxycytidine²⁵¹ et de la synthèse protéique mitochondriale par la tigecycline²⁵⁰ a montré une diminution de la capacité respiratoire, de la prolifération et de la viabilité des cellules LAM. De même, la maintenance et la dégradation des mitochondries endommagées, opérée en partie par les protéases mitochondriales, est nécessaire au bon fonctionnement d'une cellule. L'extinction génique de quatre protéases mitochondriales (NLN, PARL, PITRM1, ClpP), ainsi que l'inhibition pharmacologique de cette ClpP avec l'A2-32-01²⁵⁸ ou ONC212²⁵⁹, entraînent un dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial et de l'OxPHOS, et donc une mort par apoptose. Au niveau de l'organelle, la mitophagie est responsable de la dégradation des mitochondries défectueuses²⁴⁰. Dans l'hématopoïèse normale comme dans une leucémie, celle-ci permet de maintenir l'état quiescent des CSL, à travers le maintien de l'OxPHOS et donc de la production de ROS à un niveau faible^{22,260}. Dans les leucémies, elle permet le maintien et le renouvellement des CSL. Cibler des enzymes clés de la mitophagie, comme FIS1 avec une extinction génique²⁶¹ ou p62 avec l'inhibiteur pharmacologique XRF3F2²⁶², entraîne une baisse de prolifération et la mort cellulaire. Certaines protéines de la mitophagie sont même liées négativement au pronostic

INTRODUCTION

des patients²⁶³. La production et le maintien de mitochondries viables est donc une nécessité pour les cellules LAM.

La mitochondrie est au centre du métabolisme énergétique, puisque la majorité de **la production d'ATP se fait au sein de la mitochondrie** dans les cellules cancéreuses et proliférantes¹²⁵, et donc les LAM. Cette production est due à l'activité de l'ATP Synthase, ou complexe V de l'ETC. Cette protéine régénère l'ATP à partir d'ADP et d'un groupement phosphate libre, grâce au potentiel de membrane mitochondrial. En effet, la différence de concentration en protons entre l'espace inter membranaire et la matrice mitochondriale génère un flux utilisé par l'ATP Synthase. Ce gradient de proton est quant à lui généré par l'activité des ETC. Grâce aux cofacteurs NADH et FADH₂, ils génèrent un flux d'électrons entre les complexes et le transport actif des protons dans l'espace inter membranaire. Dans les LAM, de nombreux ciblage pharmacologiques directs des complexes de l'ETC permettent une baisse de l'activité de l'OxPHOS, de la prolifération et de la viabilité des blastes (**Figure 15**). Certains de ces inhibiteurs sont actuellement en essai clinique pour le traitement des LAM : l'IACS-010759 (NCT02882321)²⁶⁴, la metformine (NCT01849276, NCT022001381), ONC-201 (NCT02392572, NCT03932643).

La production d'ATP dépend également de la **balance ADP/ATP**, qui peut également être ciblée. Les cellules utilisent la créatine, formée à partir d'ARG, comme une réserve d'énergie. En effet, lorsque les quantités intracellulaires d'ATP sont élevées, la créatine peut être phosphorylée en phosphocréatine par l'enzyme créatine kinase mitochondriale (CKMT1). En cas de besoins rapides en ATP, par exemple lors de l'induction de la prolifération cellulaire ou la résistance à une drogue, la phosphocréatine peut être reconvertie en créatine par CKMT1, régénérant ainsi l'ADP en ATP^{265,266}. Un sous-groupe de LAM, celui portant l'oncogène EVI1, surexprime CKMT1²⁶⁷. Cibler CKMT1 avec son inhibiteur, la cyclocréatine, permet de déréguler la balance ADP/ATP. Ces cellules leucémiques accumulent alors l'ATP, inhibant thermodynamiquement la production d'ATP et la viabilité cellulaire²⁶⁷.

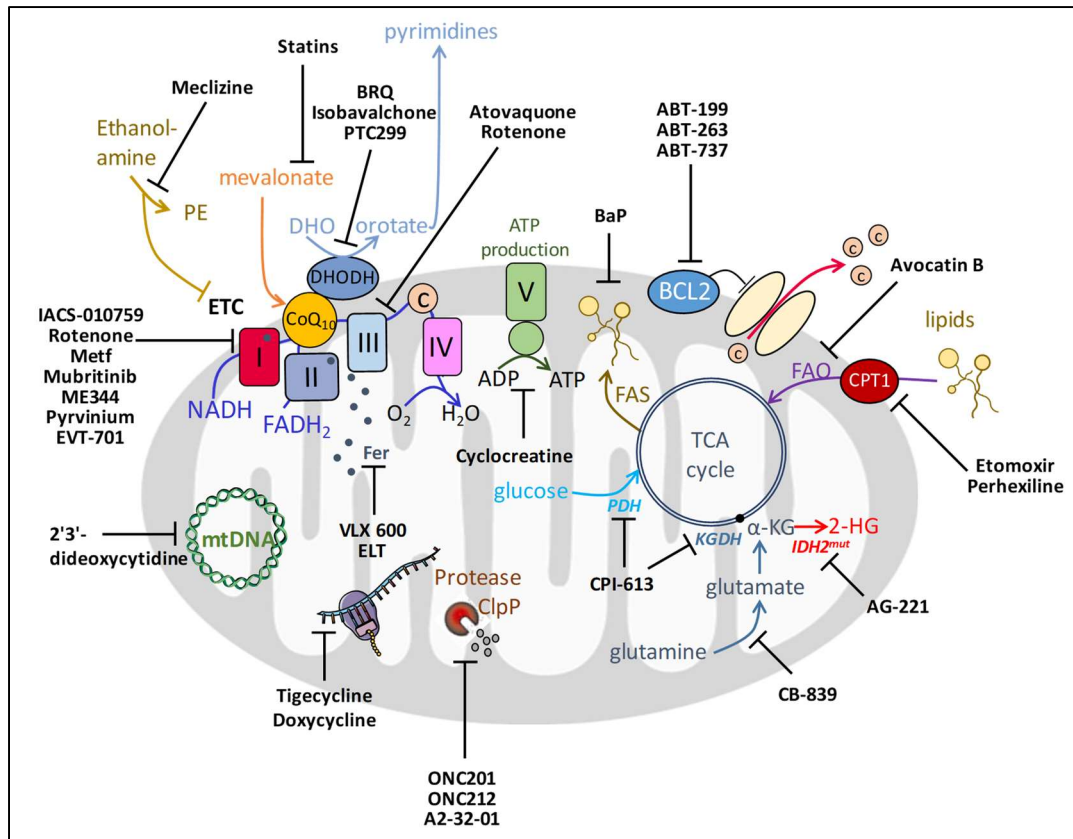


Figure 15. Molécules ciblant le métabolisme mitochondrial.

(Adapté de *Stuani et al.*¹⁴²)

La chaîne respiratoire est également impliquée dans la **prolifération cellulaire**. Un des transporteurs d'électrons entre les complexes de la chaîne respiratoire, l'ubiquinone, est régénéré à l'aide de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), enzyme de la synthèse des pyrimidines²⁶⁸ et l'inhibition pharmacologique (Brequinar ou BRQ, Isobavalchone ou PTC299) de cette enzyme montre des effets prometteurs sur la survie des LAM *in vivo*^{269,270}. Les ETC, en tant qu'accepteurs des électrons du cofacteur NADH, participent à la production d'aspartate et de pyrimidine, et sont alors nécessaires à la prolifération²⁷¹. Le ciblage des ETC semble ainsi promettre un arrêt de la prolifération. Cependant, cela entraîne une augmentation de l'expression de la transaminase produisant de l'aspartate GOT1 et une augmentation de la fermentation du pyruvate en lactate, qui régénère le NAD⁺²⁷¹. Les cellules leucémiques présentent donc une flexibilité métabolique, qui devra être prise en compte afin de cibler ce lien entre métabolisme mitochondrial et prolifération cellulaire. Le cycle des folates, qui a en partie lieu au sein de la mitochondrie, permet de renforcer ce lien entre activité mitochondriale et prolifération. Impliquée dans la synthèse des purines, cette voie métabolique alimente également la traduction protéique en groupements formyles, nécessaires à l'initiation de la traduction²⁷². Une des enzymes du cycle des folates, la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT2), convertit la sérine en glycine, précurseur de la synthèse des hèmes, impliquées dans le transport et le métabolisme du fer²⁷³.

INTRODUCTION

Le **métabolisme du fer** commence à être étudié dans les LAM. Le fer est utilisé principalement dans la mitochondrie, pour alimenter la synthèse des hèmes et former les complexes fer-soufre présents dans les complexes de la chaîne respiratoire. Les LAM et les syndromes myélodysplasiques, hémopathies dégénérant très souvent en LAM, peuvent présenter des sidéroblastes en couronne (RS)²⁷⁴. Ces cellules sont caractérisées par une accumulation de fer au sein de leurs mitochondries, suite à un défaut de la synthèse des hèmes²⁷⁵ et sont de pronostic défavorable²⁷⁶. De plus, les protéines transportant et stockant le fer, les ferritines, sont surexprimées dans les LAM, dans les CSL, et sont enrichies dans le plasma suite à un traitement à l'AraC²⁷⁷. De hautes concentrations sériques en ferritine (>1000 ng/mL) ont un impact négatif sur la survie globale des patients²⁷⁸. Quelques molécules permettent de réduire les concentrations de fer intracellulaires : la deferoxamine (DFO) et le deferasirox (DFX) piègent le fer total, tandis que l'eltrombopag (ELT) uniquement le fer mitochondrial. Ces molécules ont un effet antileucémique^{279,280}. De façon intéressante, ELT permet également une sensibilisation accrue à l'AraC²⁸⁰, qui augmente le métabolisme mitochondrial²¹⁸. Une étude de mon équipe encore non publiée suggère que ELT diminue l'activité des complexes de l'ETC, en piégeant le fer mitochondrial nécessaire à la formation des complexes Fe-S, nécessaires à l'activité de ces enzymes (*Saland et al.*, en préparation). Enfin, priver les cellules LAM de leur pool d'hème inhibe leurs chaînes respiratoires et les sensibilise à l'apoptose induite par des traitements comme Venetoclax²⁸¹. Le métabolisme du fer est donc fortement lié au métabolisme mitochondrial et le cibler pourrait permettre la consolidation de traitements déjà existants.

La mitochondrie est aussi **un des sites de production majeurs de ROS**. Le flux d'électrons prenant place dans la membrane mitochondriale suite à l'activité des ETC peut réagir de façon non-spécifique avec l'O₂ pour former des anions superoxydes (O₂^{•-})²⁸², qui peut à son tour réagir avec de nombreuses molécules pour former des peroxydes et des radicaux libres, formant la famille des ROS¹⁵. Un système de détoxification de ces ROS existe au sein des cellules. Le glutathion, lui-même régénéré par le NADPH, et certaines enzymes, comme la superoxide dismutase (SOD), permettent de métaboliser les ions O₂^{•-} en H₂O₂ puis en H₂O²⁸³ (**Figure 16**). Les ROS, hautement instables, peuvent réagir avec de nombreux éléments de la cellule, comme l'ADN en le rendant instable et mutagène, les protéines en les déstructurant et les rendant inactives, ou les lipides en les peroxydant et rendant les membranes de la cellule instables²⁸⁴. Ceci induit alors l'apoptose des cellules. Les ROS ont cependant un rôle important dans la signalisation cellulaire, notamment dans la prolifération cellulaire. Certains facteurs de transcription, comme HIF ou FOXO, peuvent sous l'effet de l'oxydation par les ROS, s'activer ou se désactiver (**Figure 16**). Dans l'hématopoïèse normale, les CSH maintiennent leurs niveaux de ROS à des taux bas, leur permettant par exemple d'activer FOXO3a qui régule la mitophagie, et ainsi de limiter leur métabolisme mitochondrial et d'éviter une prolifération trop importante et de maintenir leur

quiescence^{21,285}. Bien les LSC soient également caractérisés par de faibles taux de ROS^{286,287}, les blastes leucémiques en prolifération ont des taux très élevés de ROS²⁸⁸, couplés à un système de régulation des ROS très efficace²⁸⁹. Ce système est cependant fragile, puisque certains traitements permettant l'induction des ROS dans les blastes (AraC²¹⁸, Venetoclax²⁹⁰) et leur mort par apoptose.

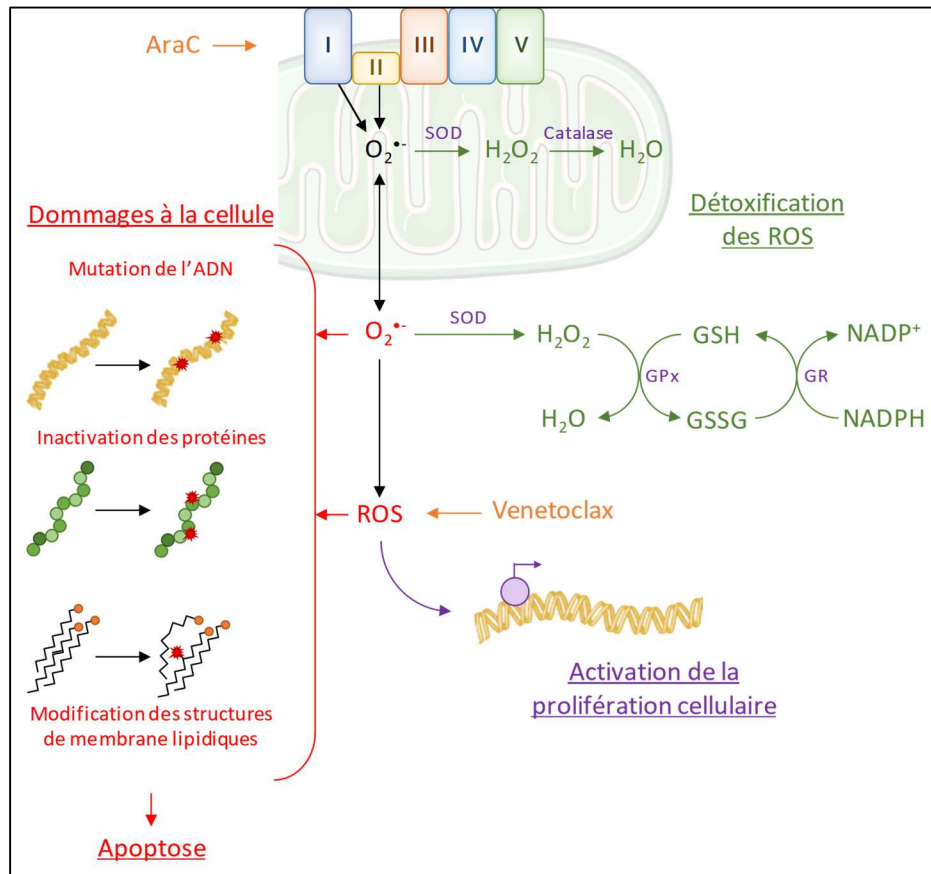


Figure 16. Les ROS mitochondriaux

La mitochondrie est aussi au centre de la **résistance aux différents traitements**^{81,142,180,241}. Une des nouvelles thérapies, Venetoclax, a d'ailleurs pour mécanisme d'action principal l'induction de l'apoptose. L'apoptose mitochondriale est initiée par des facteurs de stress qui vont permettre l'ouverture de la membrane mitochondriale, inhibant le métabolisme énergétique et libérant le cytochrome c. Ce cofacteur pourra alors activer les caspases en formant des apoptosomes et initier l'apoptose. L'ouverture de la membrane mitochondriale est possible par l'association de plusieurs protéines pro-apoptotiques en un pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). Dans une cellule saine, ces protéines sont associées à des protéines anti-apoptotiques comme BCL2 qui empêchent la formation du mPTP. Venetoclax est un inhibiteur de BCL2, permettant donc l'association des protéines pro-apoptotiques, le relargage du cytochrome c et l'activation des caspases (**Figure 17**).

INTRODUCTION

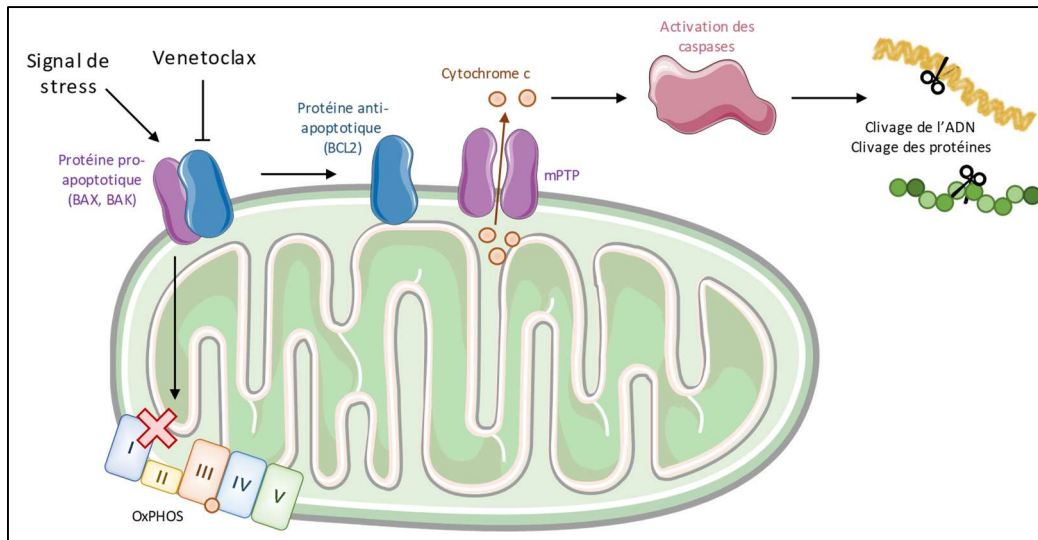


Figure 17. Apoptose mitochondriale.

(mPTP, pore de transition de perméabilité mitochondriale ; OxPHOS, oxydations phosphorylantes)

EN BREF

La mitochondrie est une actrice centrale du métabolisme cellulaire. Elle relie le métabolisme énergétique, la flexibilité métabolique, la prolifération cellulaire et les mécanismes de mort par apoptose au sein d'une même organelle. Les études publiées ces dernières années montrent aussi son rôle majeur dans la réponse aux traitements dans les LAM. Elle présente ainsi un intérêt crucial d'étude et de nombreux traitements la ciblant ont été proposés (**Figure 15**).

INTRODUCTION

Flexibilité métabolique et résistance aux traitements

En complément de leur hétérogénéité phénotypique (mutations, stades de différenciation), les cellules LAM possèdent également une grande hétérogénéité métabolique qui empêche l'utilisation d'un traitement unique²⁹¹. Ainsi, par exemple, cibler l'utilisation du glucose inactive mTORC1 au sein des cellules leucémiques, ce qui entraîne une augmentation de l'OxPHOS¹⁶². A cette hétérogénéité s'ajoute la flexibilité métabolique dont font preuve les cellules LAM dans la résistance aux traitements. Trois nutriments principaux permettent d'alimenter le cycle de Krebs, responsable de la régénération des cofacteurs nécessaires à la respiration et l'OxPHOS : le glucose, qui génère du pyruvate à travers la glycolyse, les acides aminés, qui sont utilisés après transamination, et les acides gras, suite à la β -oxydation. Selon les stress dus aux différents traitements, les blastes optimisent l'utilisation de ces nutriments pour alimenter leur métabolisme énergétique¹⁴⁰. L'augmentation du métabolisme lipidique permet la résistance à l'AraC²¹⁸ et à la combinaison Venetoclax + azacytidine dans les CSL^{84,86,292}. De plus, il est connu que les cellules IDH^{m181} ou FLT3^{m182} dépendent énormément de la glutaminolyse pour alimenter le cycle de Krebs. Traiter ces deux sous-groupes avec leurs inhibiteurs respectifs entraîne une reprogrammation qui favorise encore l'utilisation des acides gras^{81,182,242}.

Les cellules leucémiques possèdent donc la capacité de moduler leur métabolisme en fonction des stress rencontrés suite à un traitement. **Cette flexibilité métabolique est directement impliquée dans la résistance aux traitements**, et il est nécessaire de comprendre au mieux ces mécanismes afin d'éradiquer la maladie résiduelle. Cette reprogrammation métabolique peut cependant représenter un atout dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. **Reprogrammer le métabolisme des cellules LAM fait apparaître des dépendances métaboliques au sein des cellules, qui peuvent ensuite être ciblées avec un traitement spécifique.** Par exemple, la résistance à l'apoptose induite par Venetoclax nécessite une synthèse de l'hème accrue²⁸¹. Il a été montré qu'inhiber la synthèse de l'hème avec la succinylacétone permettait d'affecter l'activité de la chaîne respiratoire, rendant les cellules leucémiques plus sensibles à un traitement au Venetoclax²⁸¹. Un schéma thérapeutique constitué d'un premier ciblage de la synthèse de l'hème, puis d'un traitement au Venetoclax permettrait potentiellement d'augmenter les rémissions. De même, les cellules leucémiques résistantes à un traitement à l'APR-246, inhibiteur de p53 nouvellement décrit comme un inducteur de la ferroptose, surexprimeront le transport de cystine xCT, afin d'alimenter la production de GSH nécessaire à la régulation des ROS et la résistance à cette mort cellulaire²⁰⁴. Cette reprogrammation entraîne notamment une dépendance liée à l'activité glycolytique, via l'utilisation marquée de NADPH pour réduire la cystine en cystéine^{246,247}. Dans le carcinome rénal, l'inhibition des transporteurs du glucose tue sélectivement les cellules surexprimant ce transporteur²⁴⁷. Il peut donc

INTRODUCTION

être suggéré de cibler l'activité glycolytique suite à un prétraitement à l'APR-246 afin d'éliminer spécifiquement les cellules résistantes qui auront reprogrammé leur production de GSH.

Près de 80% des patients atteints de LAM subiront une rechute suite à la présence et à la prolifération de cellules résiduelles résistantes aux traitements. Même si les traitements approuvés de la LAM se sont multipliés au cours des dernières années, l'hétérogénéité et la plasticité métabolique de ces cellules leur confèrent de multiples possibilités afin de faire face aux traitements. Il est donc nécessaire de connaître au mieux et en amont les caractéristiques du patient afin de personnaliser le traitement utilisé et d'en améliorer l'efficacité²⁹³. Actuellement, les biomarqueurs principalement utilisés sont de l'ordre génotypique et phénotypique, avec des techniques de plus en plus avancées et efficaces²⁹⁴, mais très peu de marqueurs métaboliques sont considérés. Or, les flux métaboliques ne peuvent pas être entièrement corrélés aux taux de production des protéines²⁹⁵. Afin de caractériser au mieux l'hétérogénéité des patients et d'optimiser les traitements, il est donc nécessaire d'identifier des biomarqueurs métaboliques qui rendront compte de la plasticité des cellules.

EN BREF

Le métabolisme d'une cellule leucémique est reprogrammé par rapport à une cellule hématopoïétique normale, ce qui permet le soutien de la prolifération et de la gestion des stress. Provenant de cellules hématopoïétiques très flexibles métaboliquement, les cellules LAM développent de façon encore plus soutenue cette flexibilité métabolique. Ce phénomène est au centre de nombreuses résistances thérapeutiques et ralenti les progressions en terme de pronostic vital des patients. De nombreux mécanismes à l'échelle de la cellule sont connus à ce jour et de nouveaux traitements sont proposés. Cependant, les cellules cancéreuses font partie d'un écosystème très hétérogène. Qu'advient-il des cellules leucémiques lorsque l'on prend en compte les microenvironnements ?

INTRODUCTION

Le métabolisme tissulaire et systémique

La moelle osseuse : le rôle et le soutien du microenvironnement

La MO est le site principal de l'hématopoïèse. De nombreux types cellulaires y résident (**Figure 18**), donnant place à un microenvironnement riche et complexe²⁹⁶. Lors de l'apparition d'une LAM, l'homéostasie cellulaire de la niche est fortement affectée par les cellules leucémiques qui empêchent l'hématopoïèse normale²⁹⁷, notamment à travers une acidification drastique de la matrice extracellulaire²⁹⁸.

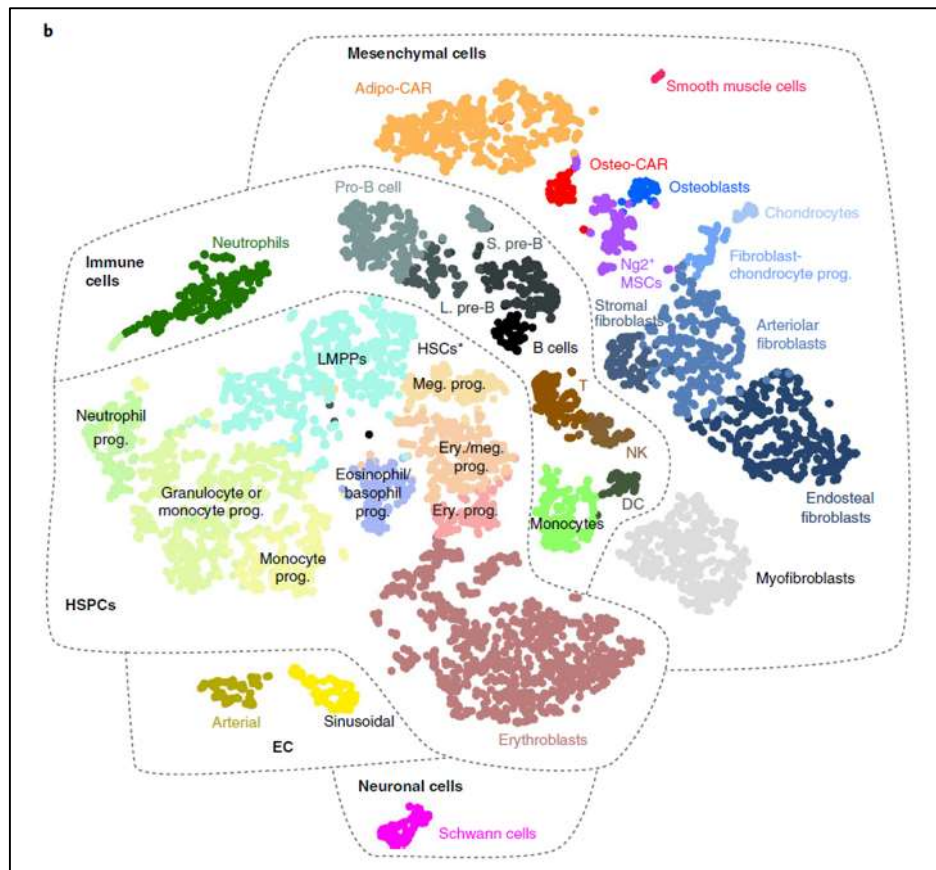


Figure 18. Distribution par type cellulaire des cellules résidentes de la MO.
(Baccin et al.²⁹⁶)

De nombreuses interactions ont déjà été décrites entre les cellules LAM et leur microenvironnement. Les cellules leucémiques, de par leur présence dans la MO, modifient le métabolisme du microenvironnement de la MO. Celui-ci pourra alors alimenter les blastes en nutriments, moduler la réponse immunitaire et diminuer l'efficacité des traitements. On parle alors de **reprogrammation métabolique tissulaire**.

Tout d'abord, la signalisation au travers d'interleukines permet la communication entre cellules stromales ou endothéliales et LAM, promouvant prolifération des blastes et chimiorésistance^{299,300}. Ce dialogue s'établit notamment par la **production d'exosomes** par les cellules LAM³⁰¹. Les exosomes sont

INTRODUCTION

des vésicules lipidiques produites par des cellules afin d'échanger nutriments, protéines, cytokines et ARN. Les exosomes produits par les cellules leucémiques ont la capacité de moduler la structure de la MO, notamment à travers l'inhibition de la différenciation des MSC en ostéocytes et de l'hématopoïèse normale³⁰². La présence d'exosomes est accrue dans le plasma des patients atteint de LAM³⁰³, mais aussi suite à un traitement à l'AraC³⁰⁴, suggérant que les échanges entre cellules pourraient être un mécanisme de résistance à ce traitement. De façon intéressante, cibler la synthèse du cholestérol, augmentée suite au traitement à l'AraC pour former les exosomes³⁰⁴, permet une réduction leucémique et une sensibilité accrue à l'AraC³⁰⁵⁻³⁰⁷, mais aussi au Venetoclax³⁰⁸.

La niche de la MO est aussi composée de nombreuses cellules immunitaires, actrices majeures de la réponse immunitaire contre les cellules leucémiques. Cependant, les cellules leucémiques ont la capacité d'**inhiber la réponse immunitaire**³⁰⁹. Comme discuté dans un chapitre précédent, les cellules leucémiques peuvent surexprimer des enzymes de synthèse des kynurénines, métabolites immunosuppresseurs. Elles peuvent également, à travers l'excrétion de nucléotides comme l'adénosine, l'ATP ou l'uridine triphosphate (UTP), activer les lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs, qui inhiberont à leur tour le système immunitaire^{310,311}. Ce transfert de nucléotides est permis par la surexpression des transporteurs de nucléotides CD39 et CD73 aux membranes plasmiques des cellules leucémiques et des lymphocytes T régulateurs³¹². Ceci est également soutenu par le fait que les patients atteints de LAM ont des populations de lymphocytes T régulateurs enrichies par rapports aux patients sains³¹³. Cet effet immunosuppresseur est accru suite à un traitement à l'AraC. En effet, les cellules chimiorésistantes surexpriment CD39^{219,314}. L'ATP extracellulaire est augmentée, ce qui a pour effet la surexpression de IDO1 dans les cellules dendritiques et la conversion des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs³¹⁵.

Le microenvironnement est également capable de **soutenir les cellules leucémiques avec de nombreux nutriments**. Les adipocytes, représentant près de 70% de la masse de la MO³¹⁶ fournit les cellules leucémiques en lipides³¹⁷, nécessaires à de nombreux mécanismes de résistance vus précédemment. Dans les LAL, suite à un traitement à l'ASNase induisant un déficit extracellulaire en ASN, les adipocytes sont capables de produire de la GLN, acteur de la résistance des cellules leucémiques³¹⁸. Les cellules mésenchymateuses surexpriment l'ASN synthétase (ASNS) et peuvent également fournir aux cellules LAL l'asparagine manquant suite à un traitement à l'ASNase³¹⁹. L'ASNase étant aussi utilisé pour traiter les LAM, ceci suggère que ce mécanisme de résistance apparaît aussi dans ce cas. De façon intéressante, les cellules stromales peuvent également convertir, via le cycle de Krebs, la GLN en ASP, qui sera ensuite utilisé par les cellules leucémiques pour la synthèse de nucléotides, favorisant la résistance à l'AraC³²⁰. Les cellules mésenchymateuses peuvent également, en plus d'un support en nutriments, échanger par contact direct leur mitochondries avec les cellules

leucémiques^{321,322}. Ce phénomène permet de soutenir le niveau élevé d'OxPHOS engendré par le traitement à l'AraC.

Enfin, la MO peut être un organe chimioprotecteur au moment de la maladie résiduelle. En effet, dans un organisme sain, les cellules mésenchymateuses sécrètent des enzymes responsables de la métabolisation des drogues, dont la cytidine déaminase (CDA) et le cytochrome P450 (CYP3A4). La présence de cellules leucémiques inhibe cette production d'enzymes. Suite au traitement à l'AraC et à la mort des cellules leucémiques, les cellules mésenchymateuses expriment et relâchent ces deux protéines en quantités supérieures³²³, permettant la dégradation du traitement et la protection des cellules leucémiques résiduelles.

Maladie extra-médullaire et son pronostic dans les LAM

Les mécanismes décrits précédemment prennent place dans les niches médullaires. Cependant, les LAM ont la capacité de coloniser des organes distants, formant ainsi ce qui est communément appelé une maladie extra-médullaire (MEM)¹⁵³. Ces MEM sont fréquentes chez les patients atteints de LAM, puisqu'une étude rapporte l'apparition de MEM dans 24% des cas étudiés³²⁴. Les organes principaux impliqués sont les ganglions lymphatiques (12%), la rate (7%), le foie (5%), la peau (5%) et les gencives (5%)³²⁴. Cette MEM, bien que diagnostiquée de façon très hétérogène fait partie des critères de rechute des patients^{50,59}. Celle-ci, selon son origine, peut être associée avec une survie globale réduite des patients, mais ne constitue pas un facteur pronostic indépendant³²⁴. Or, les études de la LAM se focalisent principalement sur les cellules leucémiques de la MO et leur microenvironnement. Par exemple, les cinétiques de diffusion et de dégradation de l'AraC sont modélisées avec des modèles de la MO³²⁵⁻³²⁸. De même, les modèles murins de la LAM sont généralement définis par la prise en greffe de la moelle osseuse et la rate, en prenant peu en compte les autres organes³²⁹⁻³³¹. Les protocoles de traitement de ces MEM sont encore rares et peu efficaces^{332,333}. De plus, l'AraC est une drogue biodisponible principalement dans la MO et la rate³³⁴. Cela rend le traitement efficace sur les cellules leucémiques présentes dans ces organes, mais diminue l'impact sur les cellules extra-médullaires. Il est donc nécessaire de comprendre quels sont les mécanismes qui entrent en jeu dans l'apparition et la résistance des MEM afin de proposer à ces patients des thérapies plus efficaces.

INTRODUCTION

Implication de l'organisme dans les LAM

Quelques études ont déjà été menées sur **les interactions opérant au niveau systémique**. Il faut alors distinguer deux effets : Les blastes présents dans les niches médullaires peuvent affecter des organes distants, redirigeant par exemple les flux de nutriments à leur avantage. On parle alors de **reprogrammation systémique**. Lorsque les blastes migrent dans un organe extra-médullaire pour y modifier le métabolisme du microenvironnement à leur avantage, on parle comme précédemment de **reprogrammation métabolique tissulaire**.

Dans un premier temps, la présence de cellules leucémiques dans la MO impacte l'organisme entier. Les premières observations soutenant cela est la modulation du métabolome du plasma des patients³³⁵⁻³³⁷. Les sucres^{174,335,336}, les acides aminés^{171,174,335,337} et de nombreuses classes lipidiques^{174,335-337} sont en concentrations significativement différentes dans les plasmas de patients atteints de LAM par rapport à des patients sains, suggérant une modulation de l'utilisation de ces nutriments, causée par les blastes. Une étude a notamment montré que la présence dans la MO de blastes inhibait la production de sérotonine par le microbiote intestinal, diminuant ainsi la quantité d'acides gras libres relâchés par les cellules intestinales. Les blastes entraînent également une diminution de la production du facteur IGFBP1 par les adipocytes des tissus adipeux. La diminution de ces trois facteurs (sérotonine, acides gras libres et IGFBP1) entraîne une inhibition de la production d'insuline par le pancréas et redirige le glucose vers la MO et les blastes, au détriment du muscle et des tissus adipeux³³⁸. De même, dans un organisme sain, la GLN est principalement produite par les poumons et les muscles, et consommée par le foie, les reins, les intestins et le système immunitaire¹⁷². Lorsqu'une tumeur est présente au sein de l'organisme, la consommation est alors monopolisée par la tumeur, et les poumons et les muscles augmentent leur production¹⁷² (**Figure 19**). Les taux de nucléotides, d'acides organiques et de lactate sont également différents dans les patients atteints de LAM³³⁵, suggérant encore une fois une modulation systémique par les blastes. Ainsi, **la présence de blastes module le métabolisme systémique au détriment de l'organisme et de certains organes, ce qui favorise leur prolifération**.

Dans un second temps, comme dit précédemment, les blastes peuvent coloniser des tissus distants. **Les blastes extra-médullaires reprogramment alors le métabolisme tissulaire au sein de ces organes, et acquièrent un potentiel de résistance aux traitements accru**. Des études ont permis de comprendre quelques mécanismes de cette résistance. Tout d'abord, les blastes peuvent migrer de la MO aux tissus adipeux. Dans cet organe, ils favorisent la lipolyse dans les adipocytes et importent les acides gras libres formés grâce à une surexpression de CD36, transporteur de lipides. Ceux-ci sont alors oxydés dans le cycle de Krebs pour soutenir l'OxPHOS des cellules leucémiques³³⁹. Suite à un traitement à l'AraC, les blastes présents dans les tissus adipeux possèdent donc un réservoir d'acides gras qui leur

permet alors d'avoir une résistance accrue au traitement (**Figure 19**). De plus, le foie est un autre organe qui peut être colonisé par les blastes leucémiques. Les acides gras produits par les cellules hépatiques fournissent encore la β -oxydation des cellules LAM³⁴⁰. Les cellules leucémiques, lorsqu'elles colonisent un organe, provoquent des lésions tissulaires qui empêchent le bon fonctionnement de l'organe^{341,342}. Le foie étant un organe majeur de la métabolisation des toxines, ses cellules produisent en grande quantité la protéine CDA. Les lésions provoquées par les cellules leucémiques permettent alors l'externalisation massive de cette protéine, qui pourra alors dégrader l'AraC lors d'un traitement et protéger les cellules leucémiques au sein de l'organe³⁴⁰ (Figure 19). Enfin, lorsque l'on cible génétiquement et pharmacologiquement le transporteur de la GLN SLC1A5, les cellules leucémiques perdent leur capacité à coloniser le poumon et le foie¹⁷⁷. Le poumon étant l'organe principal de production de GLN¹⁷², cela suggère que les blastes peuvent trouver au sein de ces organes un environnement favorable au soutien d'une glutaminolyse accrue (**Figure 19**). Même si cela n'a pas encore été étudié, ceci suggère que le poumon et le foie pourraient offrir un contexte favorable aux métastases dans les sous-groupes IDH^m et FLT3^m, qui reposent sur cette glutaminolyse.

Ces quelques études démontrent le lien fort entre devenir des cellules leucémiques et reprogrammations métaboliques tissulaires et systémiques dans les LAM. De façon intéressante, une étude a également pu démontrer que l'expression de PDK1 dans les cellules du cancer du sein favorisait les métastases au foie, et que l'utilisation du pyruvate était différente selon le site de métastase³⁴³. Les métastases sont les premières causes de mort chez les patients atteints de cancer^{344,345} et la maladie extra-médullaire est de très mauvais pronostic chez les patients atteints de LAM³⁴⁶⁻³⁴⁹. Il est donc crucial de comprendre quelles reprogrammations métaboliques tissulaires et systémiques s'opèrent afin de cibler thérapeutiquement les métastases, dans les LAM comme dans d'autres cancers.

INTRODUCTION

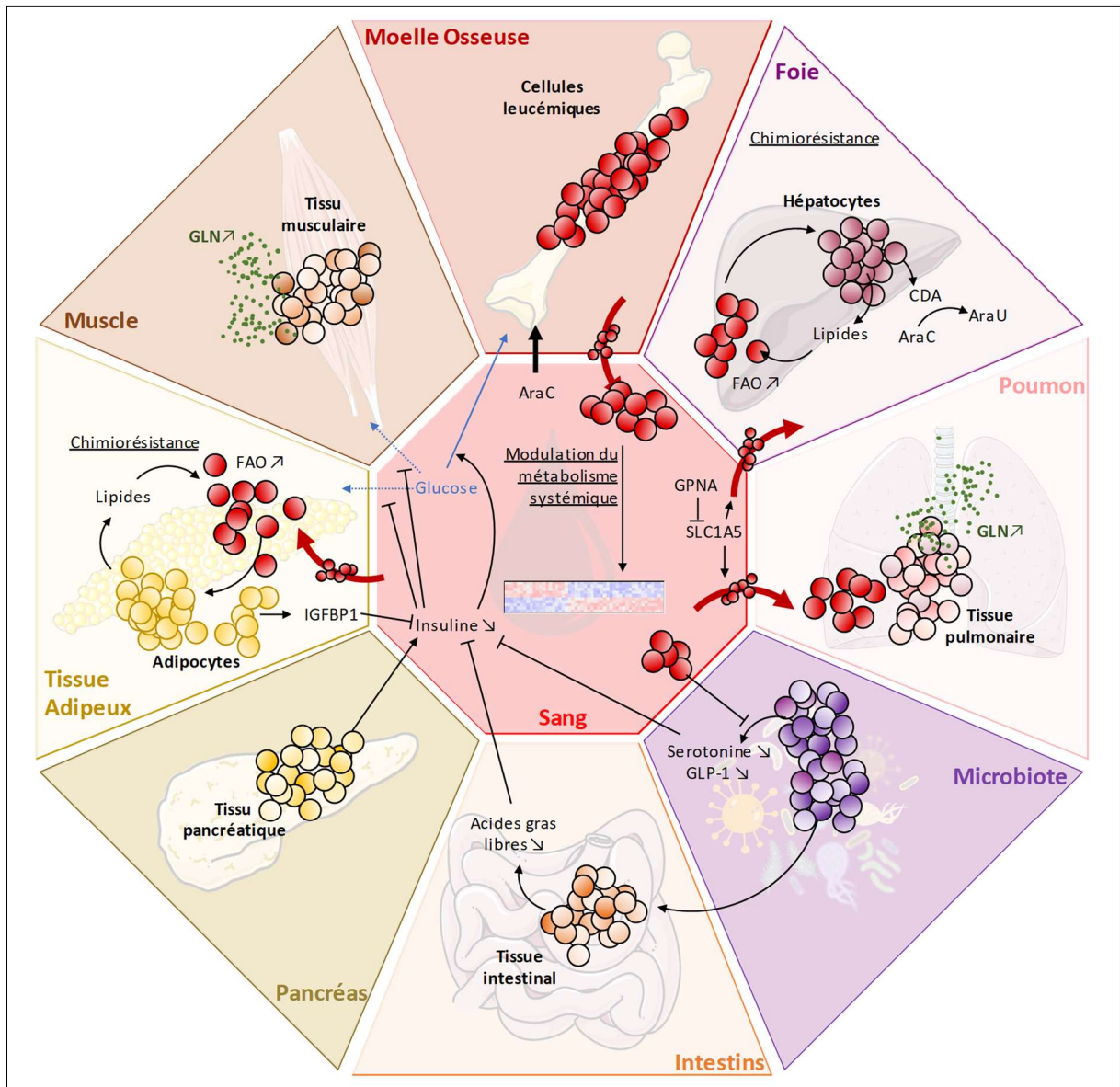


Figure 19. Interaction entre LAM et tissus.

(GLN, glutamine ; FAO, β -oxydation des acides gras ; IGFBP1, insulin-like growth factor-binding protein 1 ; GLP-1, glucagon like peptide- 1 ; AraC, cytarabine ; AraU, arabinouridine ; CDA, cytidine deaminase ; GPNA, L- γ -Glutamyl-p-nitroanilide ; SLC1A5, solute carrier family 1 member 5)

EN BREF

Un quart des patients atteints de LAM présentent une maladie extra-médullaire, ce qui détériore leur pronostic de survie. Les dialogues mis en place au sein de la MO pour soutenir les cellules leucémiques dans leur prolifération et résistance aux traitements commencent à être connus et des cibles thérapeutiques ont déjà été proposées. Cependant, peu de choses sont connues sur les mécanismes de dissémination des blastes leucémiques de la MO dans les organes extra-médullaires et sur **la reprogrammation métabolique tissulaire** qui se met en place. De plus, il est évident que la présence d'une LAM affecte le métabolisme systémique, notamment à travers le métabolome des plasmas. **La reprogrammation métabolique systémique** suite à l'apparition de la maladie et suite aux traitements est actuellement mal connue.

Hypothèses & Objectifs

L'hématopoïèse normale est caractérisée par une hétérogénéité cellulaire et phénotypique très importante, ainsi qu'une flexibilité métabolique qui leur permet de répondre aux demandes changeantes de l'organisme en cellules hématopoïétiques et immunitaires. Les LAM émergent avec l'apparition d'événements mutagènes et leucémogènes au sein de ces populations cellulaires. Les cellules leucémiques conservent certaines caractéristiques de l'hématopoïèse normale, dont **l'hétérogénéité, l'adaptation et la flexibilité métabolique**. A mon sens, ceci est à l'origine des faibles taux de réponse et de rémission observés chez les patients et il est nécessaire de comprendre au mieux ces capacités métaboliques afin de proposer les traitements les plus efficaces.

Les stress appliqués aux cellules leucémiques durant les traitements engagent de nombreux mécanismes de résistance, dont un des marqueurs majeurs des cancers : le métabolisme. Trois principaux axes sont mis en place : **l'augmentation du métabolisme mitochondrial, l'adaptation de l'utilisation des nutriments** aux besoins cellulaires, et les **dialogues et échanges avec le microenvironnement tumoral**. Ces reprogrammations font apparaître de nouvelles dépendances, qui ont permis de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques en clinique. Cependant, de nombreux mécanismes sont à découvrir et étudier. Il est donc encore crucial d'étudier le métabolisme des LAM, dans l'ensemble et dans chaque sous-groupe de patients.

De nombreux traitements existent aujourd'hui, ce qui nécessite l'identification de critères permettant de choisir la thérapie la plus adaptée au patient. Cependant, la plupart des marqueurs utilisés à ce jour sont liés à l'état général du patient (âge, ...) ou aux caractéristiques génétiques ou phénotypiques (mutations, arrêt en différenciation des blastes, ...) des cellules leucémiques. Cela ne prend donc pas en compte la flexibilité métabolique des blastes. En effet, les caractéristiques génomiques et transcriptionnelles d'une cellule ne corréleront pas entièrement à l'état métabolique d'une cellule. L'identification de **biomarqueurs métaboliques cellulaires et systémiques** est donc nécessaire, puisqu'ils sont au plus proche des capacités d'adaptation. A mon sens, cela permettra de personnaliser les traitements des patients et d'améliorer leur prise en charge.

Les mécanismes de prolifération des cancers et de résistance aux traitements ont été décrits au cours des dernières décennies au moyen de nombreux outils. L'apparition des premières lignées cellulaires immortalisées et le développement de milieux de culture ont permis d'obtenir les premières avancées sur la compréhension des cellules cancéreuses. Cependant, ces modèles, dit *in vitro*, sont très éloignés des conditions dans lesquelles évoluent les cellules cancéreuses chez un patient. Les milieux de culture contiennent des quantités de nutriments bien supérieures à celles disponibles dans l'organisme, afin

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

de promouvoir la prolifération³⁵⁰. Cela a un impact non négligeable sur le métabolisme des cellules³⁵¹ et donc sur les réponses aux traitements observées *in vitro*^{352,353}. Ces modèles sont également étudiés dans des conditions d'hyperoxie et en l'absence d'un microenvironnement cellulaire et moléculaire. Ils sont donc très limités d'un point de vue physiologique. Pour cela, des modèles *in vivo* ont été mis en place. Que ce soit des modèles murins transgéniques ou de xénogreffe de cellules humaines, ou bien encore des modèles faisant intervenir d'autres espèces (poisson-zèbre, rat, drosophile, ...), ils présentent tous l'avantage d'étudier la cellule cancéreuse dans un microenvironnement physiologique et les dialogues qui en découlent. Ces nombreux outils ont ainsi permis de comprendre les mécanismes d'émergence du cancer et de résistance aux traitements, et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ces modèles présentent aussi l'avantage de pouvoir étudier les métastases ou, dans le cas des LAM, les **colonisations extra-médullaires**. Ce phénomène, présent dans près d'un quart des patients, détériore le pronostic vital. Quelques équipes commencent à étudier les mécanismes intervenant dans la maladie extra-médullaire, mettant en évidence le rôle chimio-protecteur de quelques organes envahis. De même, l'apparition d'une LAM impacte l'organisme, modulant le **métabolisme systémique**. Les cellules cancéreuses sont également très similaires à de nombreuses cellules saines en prolifération, faisant de ces dernières des cibles secondaires des traitements. Comprendre quels tissus sont reprogrammés et comment le métabolisme systémique est touché permettra d'affiner les traitements proposés en les rendant plus spécifiques, et d'améliorer la prise en charge des patients.

Mon équipe a mis en place des modèles murins de xénogreffe robustes³²⁹. Des cellules primaires de patients ou des lignées cellulaires de LAM sont injectées à des souris NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, ou NSG³⁵⁴. Ces souris sont immunodéficientes, ce qui permet une prise en greffe maximale des cellules leucémiques. En utilisant ces modèles, mon équipe a pu mettre en évidence que l'adaptation de l'activité mitochondriale est un paramètre majeur de la réponse à la cytarabine²¹⁸. De ce projet ont découlé de nombreuses études, étendant le spectre des traitements étudiés (Venetoclax et inhibiteurs de IDH^m et FLT3^m) et caractérisant de plus en plus précisément les mécanismes de résistance liés au métabolisme mitochondrial accru. Il y a peu, nous avons pu mettre en évidence, par des expériences de bioluminescence, que ces modèles murins sont également pertinents dans l'étude de la maladie extra-médullaire. Les souris présentent en effet une charge leucémique disséminée au sein de leur organisme après une période de prise en greffe.

Ainsi, l'objectif de mon projet a été initialement de réaliser une stratégie multi-omique afin d'identifier de nouvelles cibles métaboliques innovantes et prédictives de la résistance à la cytarabine dans les LAM.

Pour répondre à cela, mon projet doctoral s'est séparé en trois axes majeurs :

- i. **Mettre en place des protocoles de métabolomique *in vivo* au sein de mon laboratoire**, avec en particulier un travail spécifique en termes d'échantillonnage des tissus ;
- ii. **Caractériser les métabolomes tissulaires des souris NSG naïves**, afin de comprendre le contexte des microenvironnements dans lesquels les blastes leucémiques se nichent ;
- iii. **Caractériser les reprogrammations tissulaires et systémiques apparaissant suite à la xénogreffe de cellules leucémiques et suite à un traitement à l'AraC**, en utilisant deux modèles murins de leucémie aiguë myéloïde résistant ou sensible à la chimiothérapie.

Résultats

Résultats

Cette section est séparée en deux parties : tout d'abord, je détaillerai le développement des protocoles de métabolomique *in vivo*. Ces méthodes n'étaient pas présentes dans mon laboratoire d'accueil au début de ma thèse. Ainsi dans un premier chapitre, je présente les approches qui ont été mises en place et je discute des limitations et potentielles améliorations pour de futures projets. Suite à la mise au point de ces méthodes, je présente ensuite mes résultats sous la forme de l'article en révision dans le journal « **Cancer & Metabolism** », et discuté de l'apport scientifique, des limitations et des perspectives de ce projet.

Chapitre I – Développement des méthodes métabolomiques *in vivo*

L'objectif de cette partie est de décrire les méthodes de métabolomiques *in vivo* développées durant ma thèse. Globalement, les expériences ont consisté à caractériser le métabolome de différents tissus collectés sur des souris NSG greffées ou non avec des cellules leucémiques et ayant subi ou non un traitement par l'AraC. Pour cela les souris sont sacrifiées et les tissus sont collectés. Les métabolites tissulaires sont ensuite extraits et analysés par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS). Les données de spectrométrie de masse sont traitées de façon à obtenir, lorsque cela est possible, une mesure quantitative des métabolites. La partie analytique était déjà établie au début de ma thèse pour la réalisation d'études sur cellules en culture (*in vitro*). Mon travail a consisté à établir toute la partie spécifique à l'analyse de tissus, que ce soit pour la collecte et la préparation des échantillons, ou pour le traitement et l'interprétation des données analytiques.

Les méthodes

Les méthodes de métabolomique sur tissus murins sont, pour les étapes d'analyse, similaires à celles utilisées pour l'analyse d'échantillons *in vitro* (**Figure 20**). Ces méthodes sont définies par plusieurs étapes. Tout d'abord, suite à la culture des cellules leucémiques, un échantillonnage rapide est fait par filtration des milieux de culture. Ensuite, les métabolites sont extraits grâce à des solvants composés d'acétonitrile, de méthanol et d'eau. A cette étape est ajouté un standard interne qui permettra la validation des résultats et la quantification des métabolites. Les extraits sont alors séchés pour être resuspendus dans de l'eau, solvant d'analyse. Les échantillons ainsi préparés sont alors analysés grâce à un spectromètre de masse et les données acquises sont retraitées pour quantifier chaque métabolite d'intérêt.

RESULTATS

La première étape a consisté à définir les conditions de prélèvement des organes murins de façon à échantillonner les tissus le plus rapidement possible. Ensuite, les conditions d'extraction des métabolites et de préparation des échantillons ont été établies. S'agissant de tissus, l'extraction des métabolites se fait par broyage de l'échantillon dans un solvant, qui doit être optimisé en termes de nature et quantité des solvants utilisés, quantités de tissus extraits, ajout de standard interne, etc. Après extraction, la préparation des échantillons pour l'analyse a été adaptée des méthodes utilisées pour les études *in vitro*. Ensuite, bien que les méthodes d'analyse utilisées soient identiques, le retraitement des données collectées sur les tissus a nécessité la définition de critères spécifiques afin de s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Les parties suivantes détaillent chacun des choix d'optimisation faits durant ce développement de méthode.

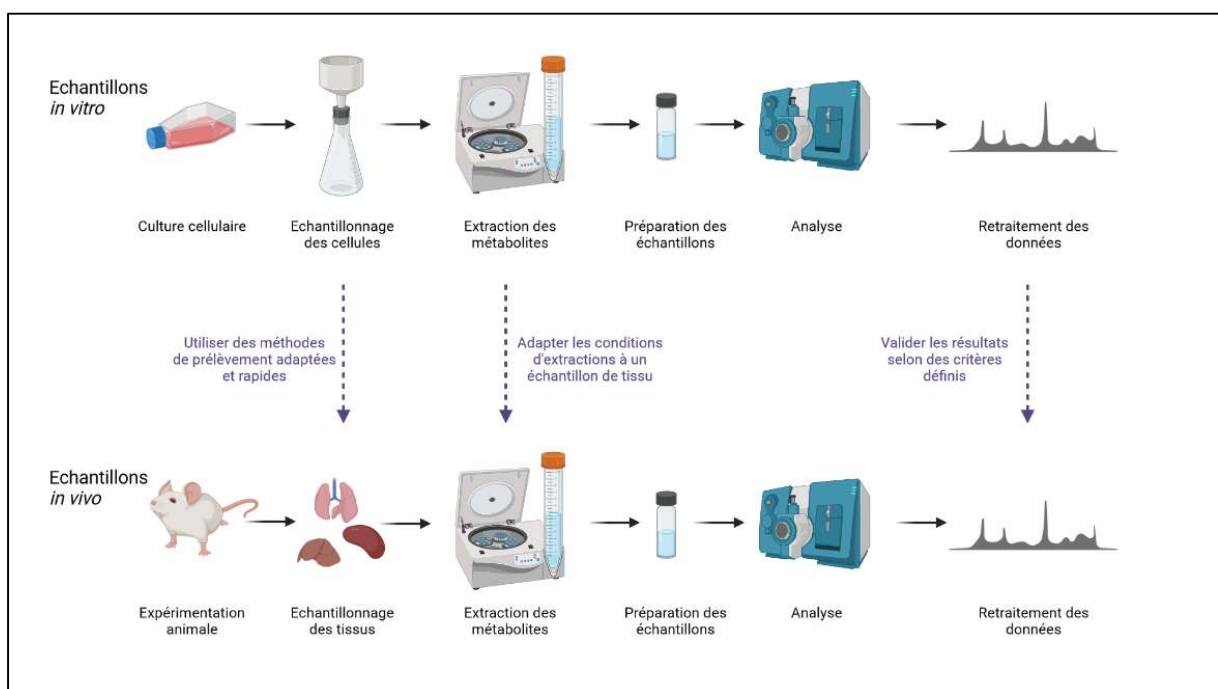


Figure 20. Etapes des méthodes d'analyse par spectrométrie de masse

Prélèvements des échantillons

La première question qui s'est posée pour le développement des méthodes concernait le prélèvement des organes. En métabolomique, une contrainte majeure est de bloquer le plus rapidement possible le métabolisme par une étape dite de « quenching » au moment de la collecte pour éviter une évolution non physiologique du contenu en métabolites lors de l'échantillonnage. En effet, de nombreuses réactions métaboliques se déroulent en quelques millisecondes. Si elles ne sont pas bloquées rapidement après collecte du tissu, le contenu en métabolites mesuré ne correspond pas à la réalité physiologique.

Pour des études *in vitro*, le temps de prélèvement est généralement limité à quelques minutes qui permettent de prélever les cellules de leur milieu de culture, de les laver et d'arrêter leur métabolisme en les congelant dans l'azote liquide. Pour une étude *in vivo*, grâce à un protocole (décrit en **Annexe I**) impliquant 4 personnes qui prélèvent le sang, sacrifient la souris, prélèvent et pèsent les organes avant de les congeler dans l'azote liquide, nous avons pu limiter le temps de prélèvement à moins de 5 minutes. Les échantillons, après quenching dans l'azote liquide, sont conservés à -80°C jusqu'à extraction et analyse métabolomique.

Extraction des tissus

Plusieurs questions se sont posées pour établir le protocole d'extraction des métabolites tissulaires, concernant le choix de la méthode d'extraction (dans l'objectif d'optimiser la récupération des métabolites) et la correction des biais d'extraction (addition de standard interne dans le protocole...).

Afin de répondre à ces questions, **nous avons tout d'abord établi la liste des métabolites d'intérêt**. En effet, selon les métabolites recherchés, les méthodes d'extraction sont différentes. Par exemple, l'extraction des lipides nécessite l'utilisation de solvants hydrophobes, tandis que l'extraction des acides organiques repose sur l'utilisation de solvants polaires comme l'eau et le méthanol. L'extraction simultanée de ces familles de composés est envisageable en utilisant des solvants triphasiques. Cependant, de nombreux composés sont solubles à la fois dans les solvants polaires et dans les solvants hydrophobes. L'analyse d'un seul échantillon n'est alors pas représentative de la totalité du pool de ce métabolite dans le tissu. Par ailleurs, le rendement d'extraction peut être très variable d'un métabolite à un autre. Des méthodes pour limiter ces biais d'extraction existent, notamment à travers l'ajout en amont de l'extraction d'un standard interne. Pour des raisons discutées ensuite, nous n'avons pas pu faire ainsi. Nous aurions également pu séparer l'échantillon de tissu en deux parties, extraites différemment afin d'obtenir des échantillons de métabolomique et de lipidomique. Cependant, cette étude étant la première du genre dans notre équipe et pour des contraintes de temps, nous avons choisi de nous focaliser sur les métabolites polaires et donc sur une seule méthode d'extraction.

Pour couvrir la diversité des métabolites polaires, chaque extrait a été analysé par deux méthodes complémentaires, qui ont été préalablement optimisées pour des analyses *in vitro*. Une première méthode permet de quantifier les acides aminés alors que la seconde permet de quantifier les nucléotides, les sucres phosphorylés, et les intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs. Les solvants d'extraction ont alors été choisis en conséquence. Pour les échantillons liquides (plasma), une simple précipitation protéique avec un mélange eau/méthanol a été utilisé. Pour les échantillons

RESULTATS

solides (autres tissus) un mélange d'eau/acétonitrile/méthanol contenant 0.1% d'acide formique pour la stabilité des composés durant les étapes d'extraction a été utilisé.

Comme mentionné précédemment, les plasmas n'ont subi qu'une étape de précipitation protéique. Le protocole est décrit en **Annexe II**. Les tissus, quant à eux, ont dû subir plusieurs étapes d'extraction. Après de nombreux essais, nous avons conclu les choses suivantes :

Tout d'abord, les méthodes d'extraction sont destructives. Afin de conserver les échantillons précieux à des fins de ré-extraction future ou d'analyse complémentaire, nous avons décidé d'extraire seulement une partie des tissus et non la totalité. Certains organes, comme la rate ou le rein, sont composés de nombreux tissus différemment positionnés spatialement. De plus, lors d'une xélogreffe de cellules leucémiques, celles-ci peuvent former des colonies dans les organes (notamment dans la rate⁷). Afin d'avoir un échantillon représentatif de ces organes, il a été nécessaire d'inclure une étape d'homogénéisation à sec et à froid des tissus, avant de procéder à l'échantillonnage et l'extraction.

Ensuite, pour optimiser les rendements d'extraction des métabolites, nous avons broyé à froid les tissus homogénéisés dans leur solvant d'extraction. Cela permet d'optimiser les surfaces d'échanges et de broyer les amas résiduels de cellules.

Une fois les extraits préparés, nous avons ajouté le **standard interne** et séché les échantillons pour pouvoir re-suspendre dans les solvants d'analyse. Le standard interne utilisé est appelé IDMS, ou Isotope Dilution Mass Spectrometry (**Figure 21**). Il s'agit d'un extrait de métabolites produits par une souche de levure, cultivée avec pour seule source de carbone du glucose entièrement marqué au carbone 13. L'ensemble des métabolites contenus dans ces extraits sont ainsi totalement marqués. Ces métabolites marqués possèdent les mêmes propriétés physiques que les métabolites naturels, composés principalement de carbone 12 : solubilité dans les solvants, vitesse de dégradation, volatilité, polarité, ... Dans l'idéal, l'IDMS est ajouté avant extraction, pour limiter les biais des protocoles d'échantillonnage. Comme ils possèdent les mêmes propriétés, les métabolites ¹²C et ¹³C auront le même comportement au cours des différentes étapes de l'analyse. Les deux formes marquées et non marquées du même métabolite peuvent cependant être séparés en spectrométrie de masse puisqu'elles ne possèdent pas la même masse. Cela permet de disposer d'un standard propre à chaque métabolite détecté. De plus, l'ajout d'un IDMS caractérisé permet de faire un suivi de la qualité des analyses de spectrométrie de masse (MS), discuté dans la partie suivante, ainsi que de quantifier de façon absolue les quantités de métabolites dans les échantillons.

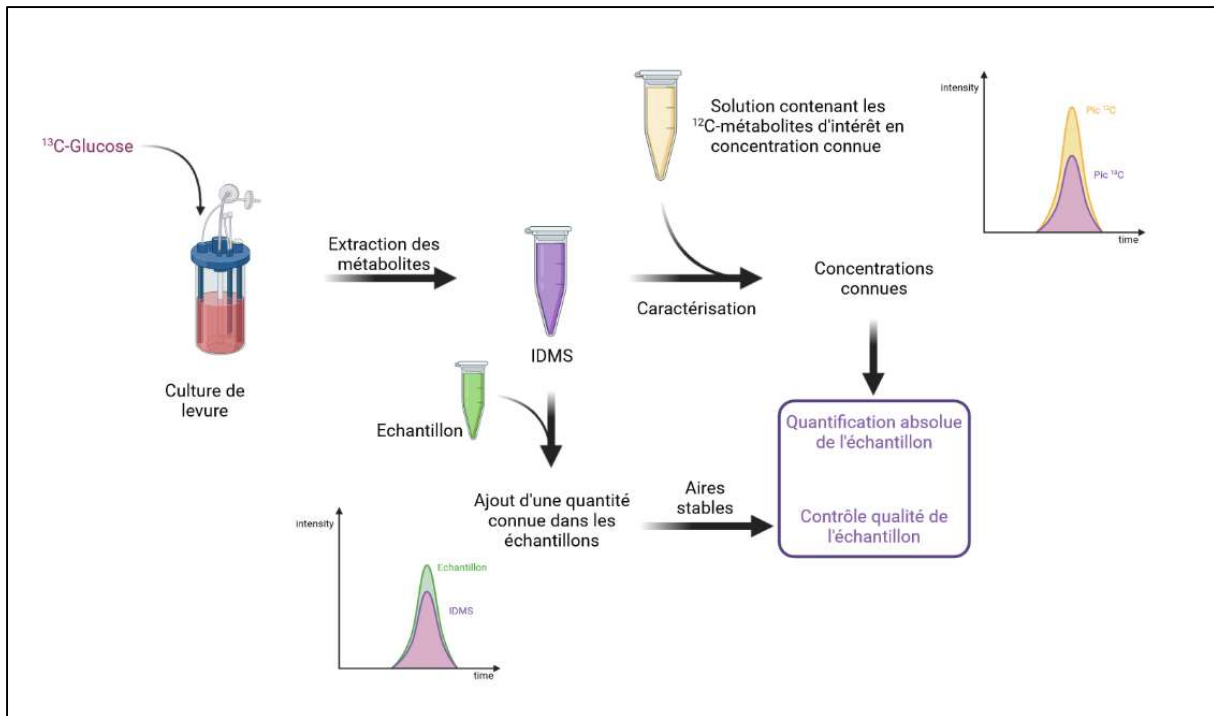


Figure 21. Préparation et principe de l'IDMS

L'IDMS est produit à partir d'extraits de levures cultivées sur du ^{13}C -glucose comme unique source de carbone. Les métabolites extraits sont alors entièrement composés de carbone 13. La caractérisation de cet IDMS se fait par une analyse MS avec pour standards les ^{12}C -métabolites. L'IDMS est alors ajouté en quantités connues dans les échantillons, afin d'assurer le suivi qualité et la quantification des métabolites recherchés.

Dans ce protocole, nous avons choisi d'ajouter l'IDMS après l'extraction. En effet, les pools de métabolites sont différents entre une levure et une cellule mammifère. Ajouter une quantité définie avant l'extraction aurait signifié que les ratios $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ aurait pu être significativement différents pour chacun des métabolites, ce qui limite grandement les possibilités de quantification absolue en fin d'analyse.

Les échantillons séchés ont ensuite été re-suspendus dans les solvants d'analyse. Le protocole d'extraction des tissus est également détaillé en en **Annexe II**.

Analyse par LC-HRMS et validation des données

Les deux méthodes utilisées reposent sur une séparation par chromatographie liquide des métabolites couplée à une analyse MS. Les composés sont séparés en fonction de leur affinité avec la colonne et avec le solvant d'élution. Ils sortent de la colonne à des temps différents, nommés temps de rétention, pour être ensuite injectés dans l'analyseur MS. La première méthode, permettant de quantifier les acides aminés, repose sur une technique de **chromatographie liquide d'interaction hydrophiles**, ou HILIC. En résumé, l'échantillon est chargé sur la colonne, enduite d'une résine apolaire. Le solvant

RESULTATS

d'élution de départ est de l'eau, solvant polaire. Ainsi, les molécules les moins polaires interagissent avec la résine et sont retenues dans la colonne. Un gradient de solvants, eau/acétonitrile, est ensuite appliqué pour finir sur un solvant composé principalement d'acétonitrile. Les molécules alors retenues par la résine apolaire éluent avec le solvant. Ce type de chromatographie permet donc de séparer les métabolites en fonction de leur polarité (**Figure 22**). La deuxième méthode, référée ensuite comme la méthode des métabolites centraux, permet l'analyse des intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs, ainsi que les nucléotides et certains sucres phosphatés. Cette méthode repose sur une **chromatographie liquide échangeuse d'ions**, qui sépare les métabolites en fonction des interactions électrostatiques. La résine à l'intérieur de la colonne est composée de groupements chargés positivement. Une fois l'échantillon injecté, un éluant composé d'hydroxyde de potassium dont la concentration augmente au cours de l'analyse est utilisé pour séparer les métabolites en fonction de leur affinité avec la colonne (**Figure 23**).

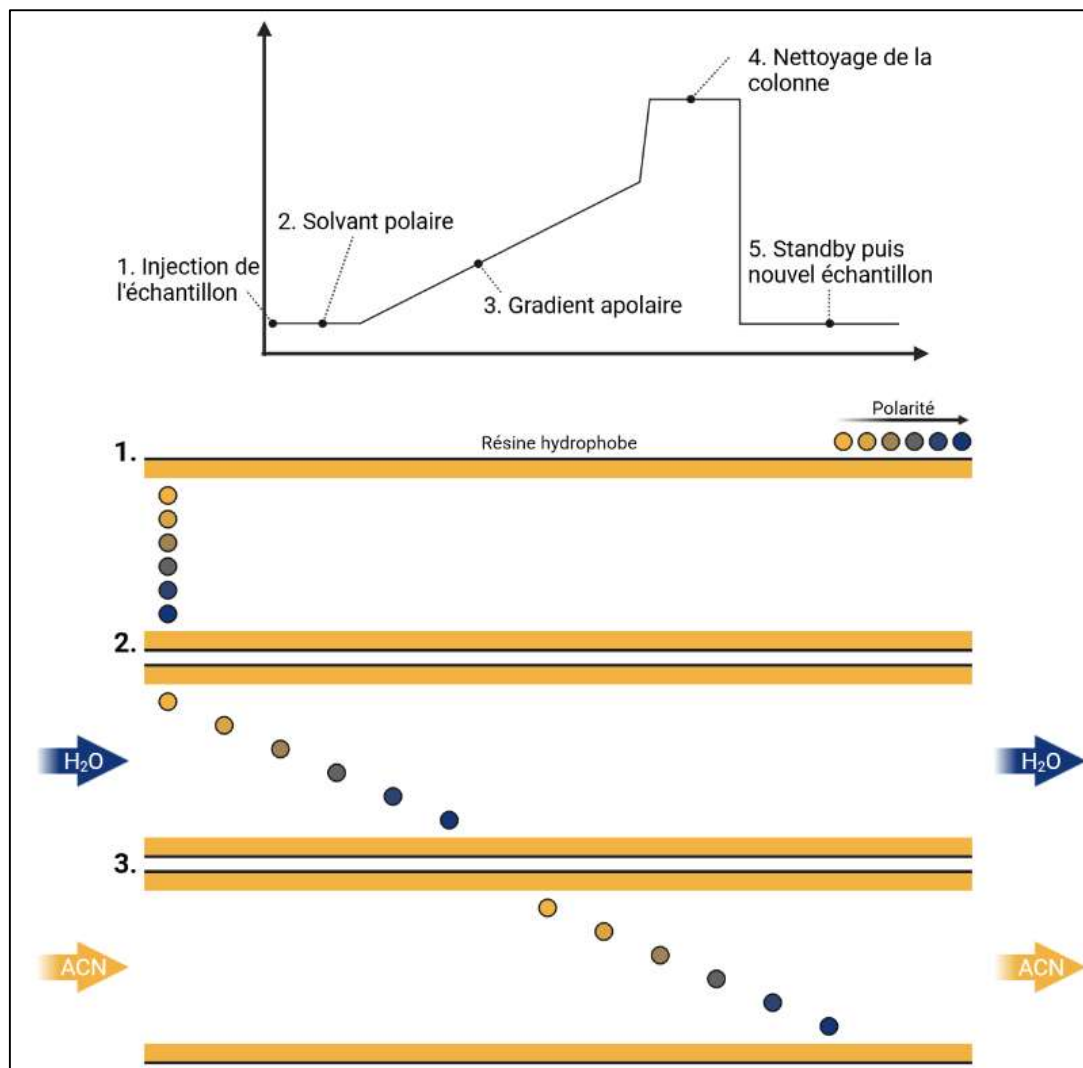


Figure 22. Principe de la chromatographie HILIC

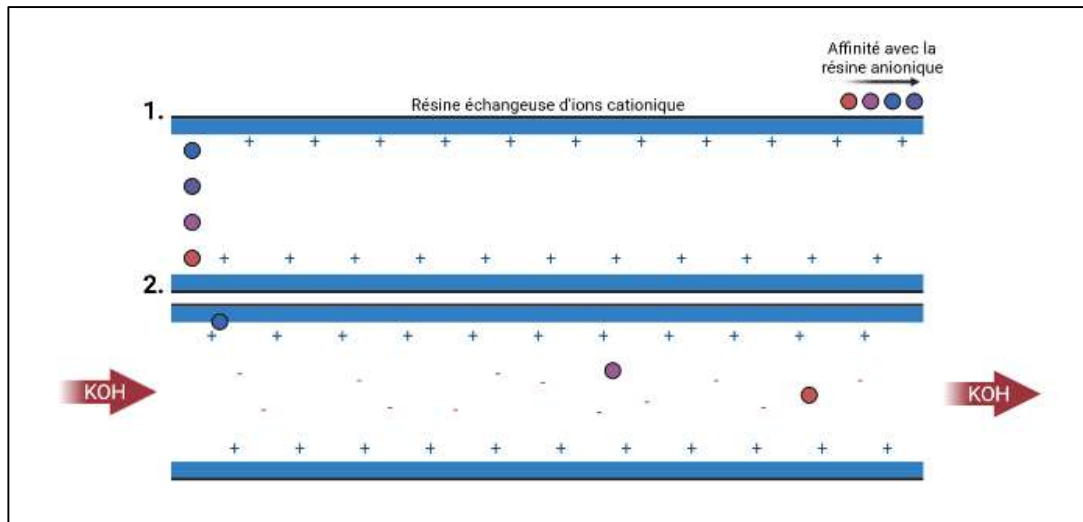


Figure 23. Principe de la chromatographie ionique

Dans ces deux méthodes, la chromatographie liquide est couplée à un spectromètre de masse de type Orbitrap (Figure 24). Cette technique d'analyse repose sur la séparation des ions en fonction de leur masse sur charge (ou m/z). Les composés élués sont injectés dans la source d'ionisation qui chargera les molécules pour analyse. Ici, la source d'ionisation est un electrospray, qui nébulisera le liquide sortant du module de chromatographie en gouttelettes chargées. L'évaporation du solvant permettra alors la dissociation des gouttelettes jusqu'à former un plasma composé d'ions qui sera analysé. Cette méthode d'ionisation est dite douce, puisque les ions formés sont majoritairement des ions moléculaires, c'est-à-dire des molécules non fragmentées. Le rendement d'ionisation peut être assez variable, nécessitant l'utilisation de standards internes pour corriger ce biais. Le plasma ionique est ensuite injecté dans la cellule d'analyse, composée de deux électrodes en forme de fuseau. Ces électrodes appliquent un champ électrostatique qui fera osciller les ions sur une trajectoire dépendante sur rapport masse sur charge (m/z). Le courant induit par ces oscillations est alors détecté et une déconvolution du signal par transformation de Fourier permet d'isoler les ions détectés sur la base du rapport m/z .

RESULTATS

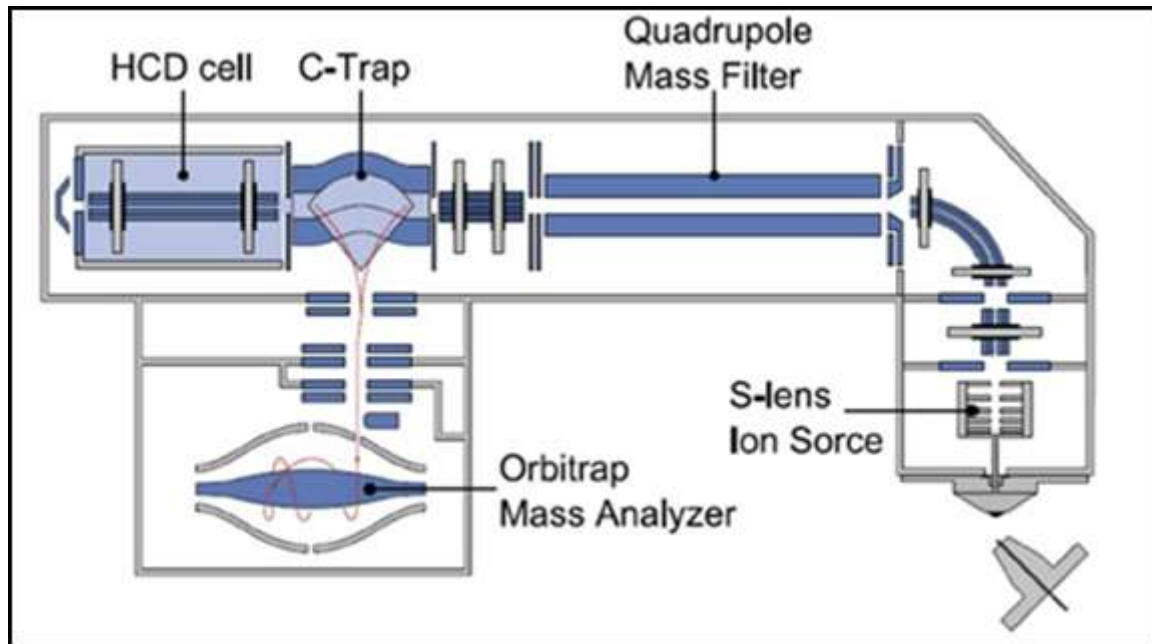


Figure 24. Schéma d'un spectromètre de masse de type Orbitrap

Il est important de noter ici que, bien que la spectrométrie de masse soit très sensible et résolutive, l'intensité du signal obtenu n'est pas proportionnelle à la quantité d'ions et peut varier entre deux échantillons. Le rendement d'ionisation des molécules est variable, y compris durant une même séquence d'analyse. L'utilisation de l'IDMS permet de corriger ce problème. En effet, les métabolites C12 et C13 ayant les mêmes propriétés physiques, leur ionisation et détection seront équivalentes. Le ratio obtenu entre ces deux composés sera donc stable au cours du temps.

Il existe deux types d'analyse en spectrométrie de masse : les analyses ciblées et non-ciblées. Dans le premier cas, des ions (métabolites) spécifiques sont recherchés, ce qui permet une grande sélectivité et une sensibilité de mesure élevée, au détriment d'une analyse sur une large plage de masse. Ce type d'analyse est souvent utilisé dans des méthodes de quantification, comme la détection de drogues ou de biomarqueurs dans des biofluides. Dans le second cas, une gamme large de m/z est détectée, permettant l'analyse sans à priori de l'ensemble des composés détectables d'un échantillon. La sensibilité est cependant moindre que pour des méthodes ciblées. Dans ce travail, nous avons opté pour des méthodes d'analyse non-ciblées. Une fois les données acquises, nous avons utilisé des méthodes de retraitement et d'intégration de pic ciblées afin de quantifier les métabolites recherchés. Les analyses étant non-ciblées, il est possible dans un second temps de rechercher dans ces données de nombreux autres composés.

Une fois les échantillons analysés et les données traitées (intégration des pics), nous avons procédé à une étape de validation des données. Pour cela, nous avons considéré trois critères principaux :

- Temps de rétention stable

Cela permet de suivre l'état général de la colonne. Souvent, lorsque l'on analyse des échantillons complexes, la colonne peut s'encrasser et se dégrader. Les métabolites sont alors moins retenus sur la colonne et le temps de rétention chute. Voici quelques exemples choisis dans les données qui illustrent les possibilités. La sérine (**Figure 25a**) est un exemple de composé pour lequel les temps de rétention restent stables. Les deux formes marquées (C13, en noir) et non marquées (C12, en violet) ont le même temps de rétention et il n'y a aucune dérive du temps de rétention. La leucine (**Figure 25b**) est un autre exemple de composé validé. Bien que les temps de rétention varient au cours du temps, ceux-ci restent dans la zone d'acceptabilité et il n'y a pas de différence entre pic C12 et pic C13. L'arginine (**Figure 25c**), quant à elle, voit son temps de rétention varier de plus d'une minute. Aucune dérive au fur et à mesure de l'avancée du batch n'est cependant à noter. Ces variations fortes s'expliquent lorsque l'on revient aux spectres (**Figure 26**). En effet, l'effet matrice (l'impact de la complexité de l'échantillon sur l'analyse) est important pour ce composé, ce qui entraîne un dédoublement de pic, dont les maxima d'intensité correspondent aux deux temps de rétentions possibles. Chaque pic a été repris pour ce composé, afin de valider que cet effet matrice était responsable de la totalité des changements. Enfin, le glucose-6-phosphate (**Figure 25d**) est un cas limite. Nous observons clairement une diminution du temps de rétention, signifiant l'encrassement de la colonne au fur et à mesure des analyses, et ce malgré la présence de blancs de lavage rajoutés dans la séquence d'analyse. Ces variations restent cependant limitées (moins d'une minute de variation totale) et similaires pour les deux isotopes (C12 et C13) et le composé a été validé.

RESULTATS

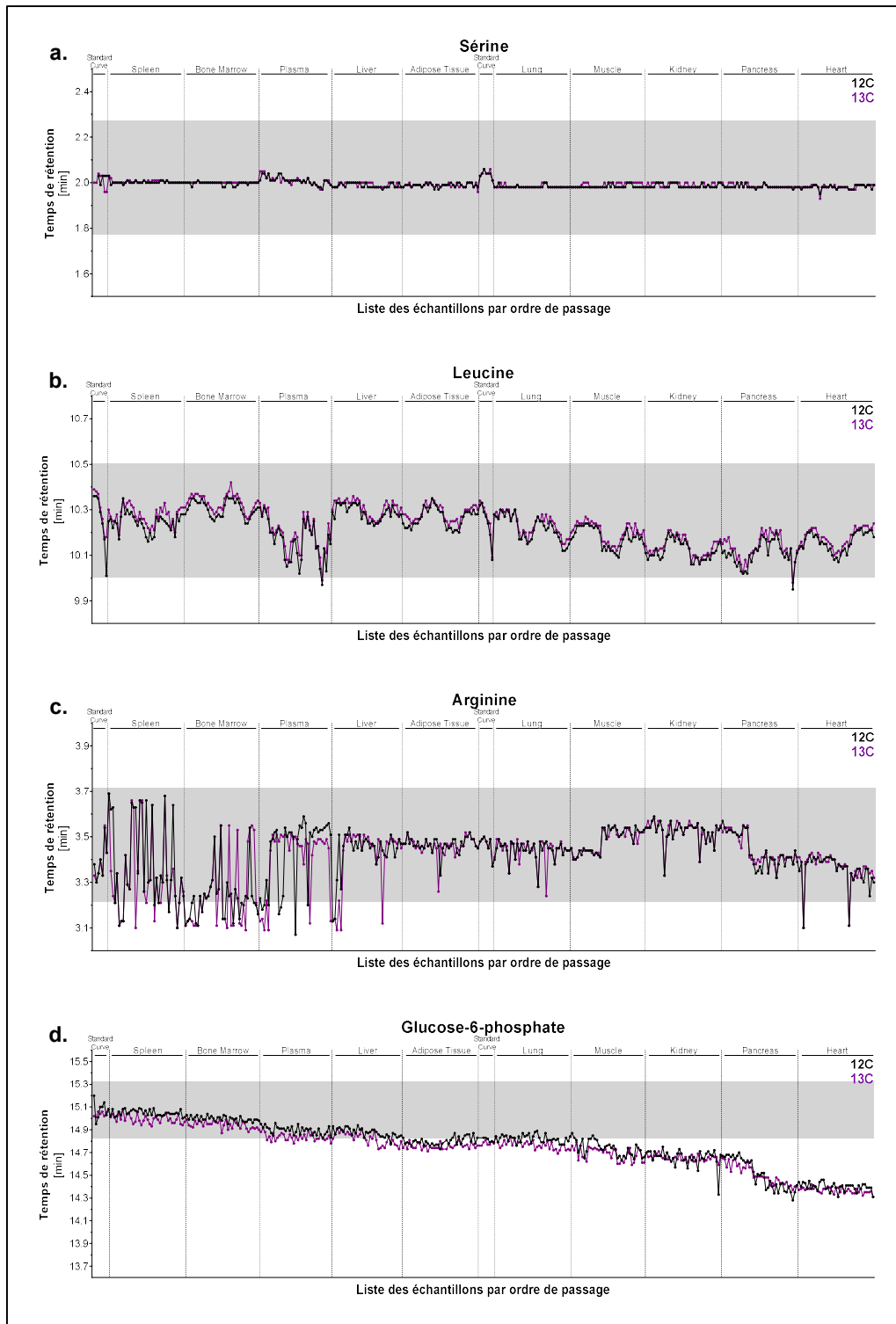


Figure 25. Exemples de suivi de temps de rétention sur la séquence d'analyse.

La courbe C12 (noir) correspond au pic du métabolite de l'échantillon. La courbe C13 (violet) correspond au métabolite de l'IDMS. La zone de validation du temps de rétention (+/- 30s par rapport à la première gamme) est grisée.

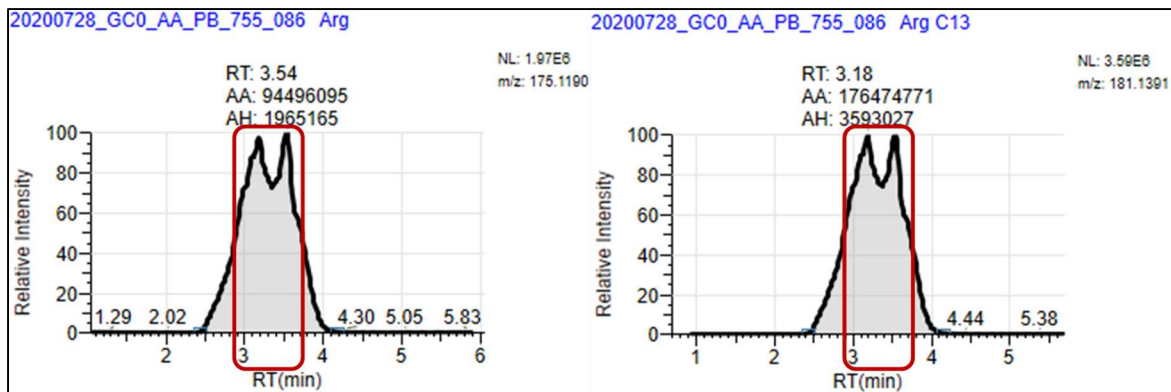


Figure 26. Exemple de chromatogrammes de l'arginine.

A gauche, le chromatogramme de l'arginine C12 (échantillon), à droite celui de l'arginine C13 (IDMS). Le pic est dédoublé suite à des effets matrices et présente deux maxima à 3.2 et 3.5 min. Le temps de rétention décrit précédemment correspond au maximum d'intensité, qui, du fait de la similarité d'intensité, peut varier entre ces deux valeurs.

- **Signal IDMS**

Le second paramètre évalué a été la stabilité du signal d'IDMS. Comme dit précédemment, la variabilité des signaux obtenus durant une séquence d'analyse peut être importante. Suivre la somme des aires des composés de l'IDMS au cours du batch permet de détecter les échantillons aberrants, dus aux erreurs de manipulation. Pour la méthode des acides aminés (**Figure 27a**), à l'exception de quatre échantillons présentant des valeurs aberrantes (points rouges sur la **Figure 27a**), exclues de la suite de l'étude, le signal est stable. Nous devons cependant remarquer que les signaux IDMS des échantillons du plasma sont plus faibles que ceux des tissus solides. Cela est dû aux quantités plus basses d'IDMS ajoutées dans ces échantillons par rapport aux tissus solides (cf. protocole). Pour la méthode des métabolites centraux (**Figure 27b**), le signal est beaucoup plus variable, démontrant la nécessité d'utiliser l'IDMS. Six échantillons ont été exclus, du fait d'une variation marquée du signal. Deux tissus, le muscle et le rein, montrent des signaux très variables durant la séquence. Cela est très certainement dû à des effets matrices majeurs dans ces tissus, couplés à un encrassement de la colonne au cours de la séquence (observé à travers la diminution du temps de rétention de plusieurs composés analysés par cette méthode). Les résultats obtenus sur ces tissus étant très reproductibles, ces échantillons n'ont cependant pas été exclus.

RESULTATS

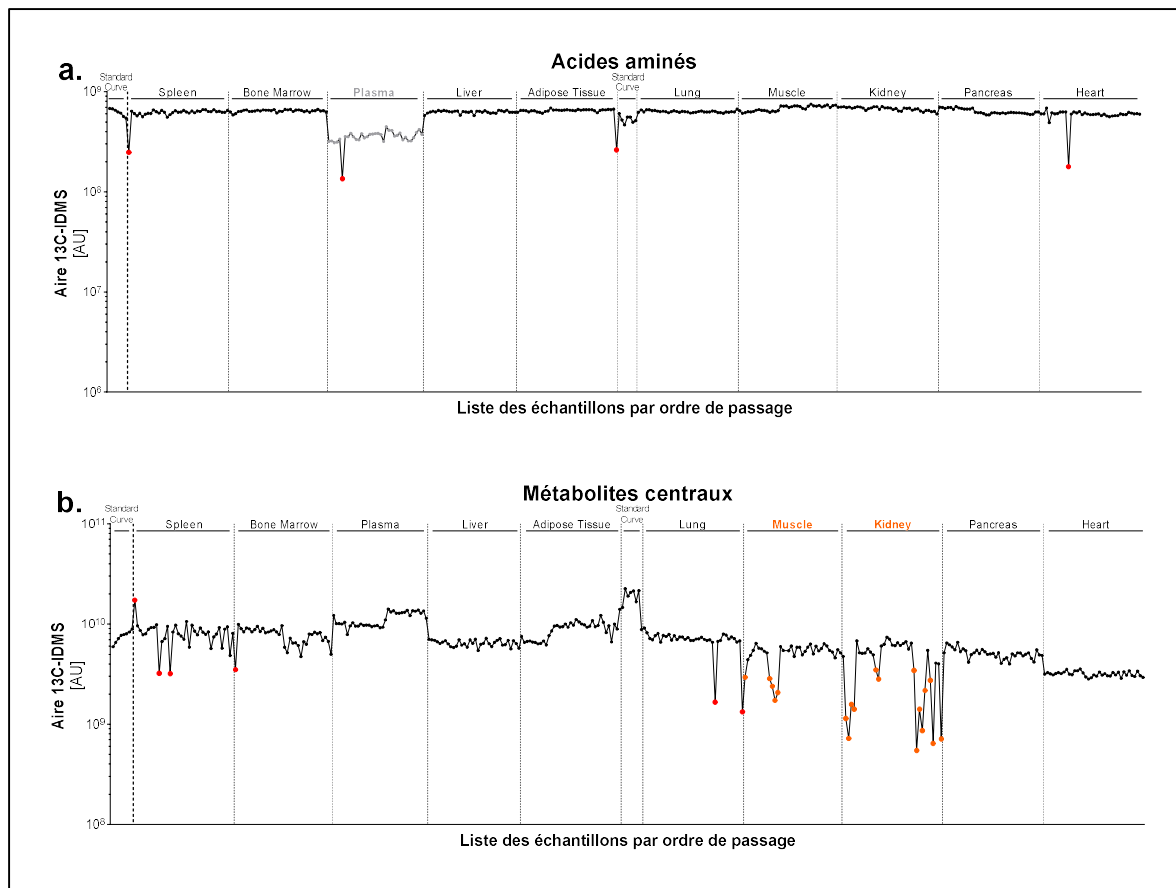


Figure 27. Mesure de l'aire totale du signal IDMS dans les différents échantillons analysés.

(a. AA, b. CM). En gris, les échantillons AA des plasmas, pour lesquels la quantité d'IDMS diffère des tissus solides (cf. protocoles). En rouge, les échantillons exclus de la suite de l'analyse. En orange, les échantillons pour lesquels la variabilité intra tissu est très importante.

- Quantification des métabolites

Le dernier critère de validation nous permet de définir le niveau de quantification (relative ou absolue) d'un métabolite. Afin de quantifier les métabolites dans nos échantillons, une gamme étalon est utilisée. Comme dit précédemment, les deux méthodes analytiques utilisées dans ce travail ont été initialement implémentées pour des analyses *in vitro*, avec des gammes étalon optimisées pour ces échantillons. L'IDMS provenant d'une culture de levures, la distribution des métabolites est différente des cellules mammifères analysées, nécessitant ainsi des quantités d'IDMS ajoutées différentes pour les différentes analyses. Afin de maximiser le nombre de métabolites quantifiables de façon absolue dans les analyses des tissus, nous avons optimisé les volumes d'échantillon et d'IDMS injectés dans l'appareil, ainsi que les concentrations de standards utilisés pour établir des gammes étalons adaptées. Nous avons tout d'abord procédé à des analyses tests d'un échantillon représentatif de chacun des tissus, en nous basant sur un ratio échantillon:IDMS de 1:1. Nous avons ensuite optimisé ce ratio à partir des rapports de concentration C12/C13 observés dans les premiers tests. Sur cette base, nous

avons établi des ratios optimaux pour les différents types de tissus et d'analyse (plasma – 1:3.5 ; tissus – 1:3 pour l'analyse AA et 1:30 pour les CM), détaillés dans l'**Annexe I**. Ces optimisations sont la raison pour laquelle nous avons ajouté l'IDMS post-extraction. Comme discuté précédemment, afin d'optimiser les quantifications des métabolites, les aires C12 et C13 doivent être similaires.

Un dernier point est à noter : nous avons pu déterminer des concentrations absolues pour la totalité des acides aminés étudiés, grâce au fait qu'ils sont tous dans une gamme de concentration très similaire dans les différents tissus. Cependant, cela n'a pas été le cas pour les métabolites centraux. En effet, cette méthode regroupe différentes classes de métabolites, dont les concentrations diffèrent grandement au sein des tissus murins. Nous avons donc dû sacrifier la quantification absolue de certains métabolites au profit d'une bonne détection des métabolites en plus faible concentration. Nous avons cependant pu obtenir une quantification relative pour la totalité des métabolites dans la plupart des tissus. **Suite à ces développements et à la validation de la qualité des données, nous avons pu analyser les profils métaboliques des tissus murins, dans les différentes conditions.**

Discussion

Première du genre dans mon équipe, cette méthode d'analyse des métabolomes tissulaires murins a permis de définir les premiers métabolomes de 10 tissus des souris NSG. A ma connaissance, la seule étude du genre retrouvée dans la littérature est la base de données MMMDB (Mouse multiple tissue metabolome database), dans laquelle des analyses de métabolomique non ciblée ont été utilisées pour mesurer les métabolomes de 11 tissus de deux souris C57BL/6.

Les méthodes développées présentent plusieurs avantages. Les analyses sont très robustes et reproductibles. On peut par exemple noter les faibles taux de variabilité de la plupart des composés analysés (**Figure 28**). Afin d'atteindre ces taux de répétabilité, il est important de prendre en compte l'âge des souris étudiées, mais aussi l'heure de prélèvement, puisque le rythme circadien des organismes vivants entraîne des cycles de concentrations métaboliques dans les organes^{355,356}. Ensuite, ces méthodes, moyennant quelques optimisations d'extraction et de préparation d'échantillons, pourraient être appliquées à d'autres modèles murins comme les C57BL/6, couramment utilisés pour l'étude des LAM. Des modèles murins sont également utilisés pour l'étude de nombreuses maladies ou phénomènes biologiques comme le vieillissement ou l'inflammation dans lesquels le métabolisme joue un rôle important. Il serait alors possible d'étendre ces méthodes à de nombreux autres tissus d'intérêt et à de nombreux modèles murins.

RESULTATS

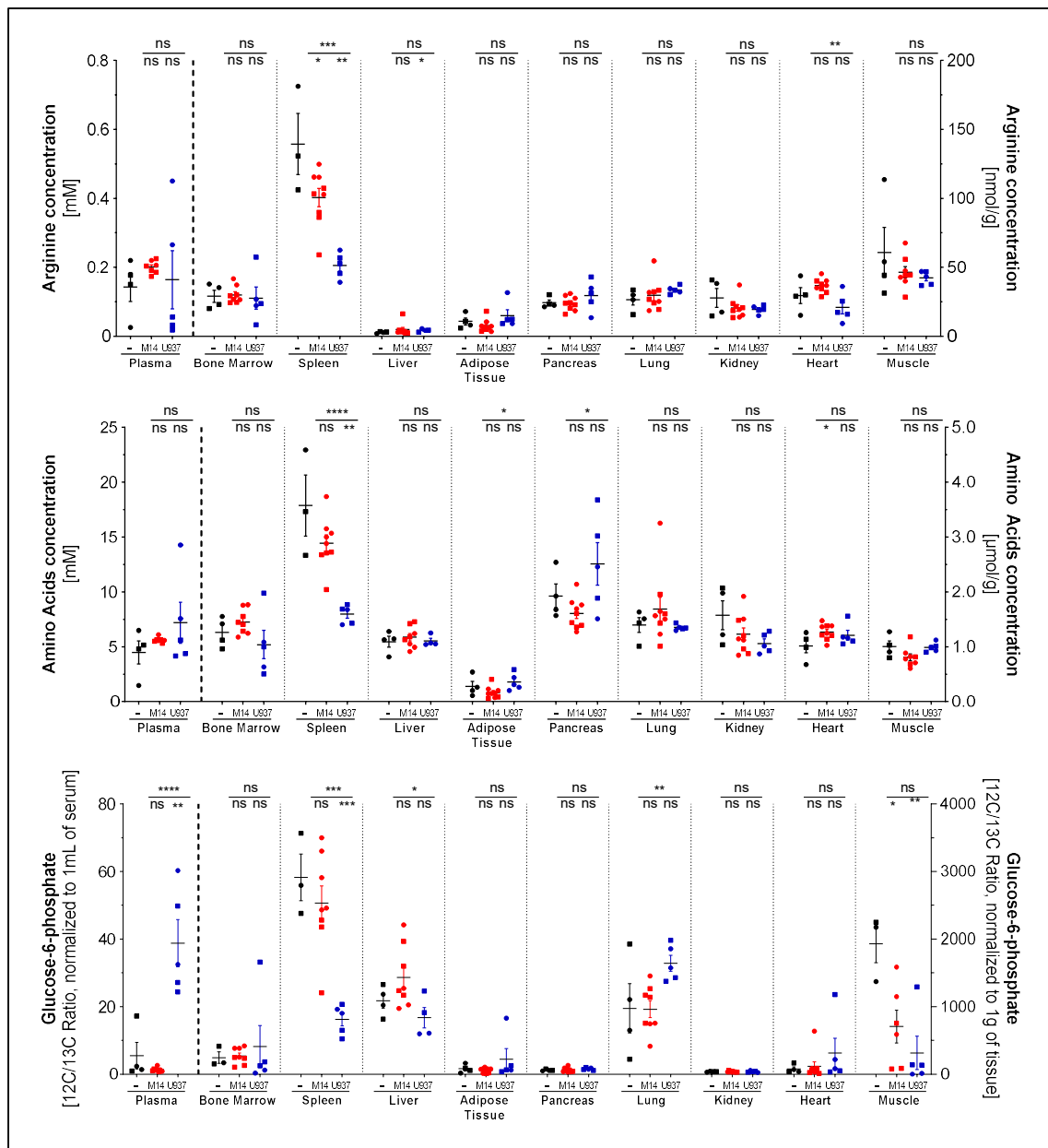


Figure 28. Exemples de la répétabilité des analyses

Ces méthodes présentent un avantage qui, pour moi, est crucial dans ce genre d'études : une partie de l'échantillon seulement est utilisée pour cette analyse. La spectrométrie de masse est une analyse destructrice, c'est-à-dire que l'échantillon analysé est perdu. La possibilité de coupler ces méthodes avec d'autres méthodes comme l'analyse d'ARN par RT-qPCR, de protéines par Western Blot, ou bien d'autres analyses de métabolomique comme la lipidomique représente un atout majeur dans la compréhension des phénotypes observés et l'étude d'hypothèses émises à partir des données de métabolomique acquises. Les modèles *in vitro* présentent l'avantage d'être robustes, faciles et rapides à reproduire. Les modèles *in vivo*, quant à eux, demandent un certain temps pour être mis en place

(certains modèles de PDX peuvent prendre en greffe en plus d'un an) et ne sont pas faciles à reproduire. A cela s'ajoute la composante éthique et la règle des 3R qui tend à restreindre au mieux le nombre d'animaux utilisés pour nos recherches. Avoir la possibilité, sur une cohorte restreinte, de pouvoir effectuer plusieurs analyses différentes représente alors un atout majeur.

Les méthodes développées possèdent cependant des limites assez marquées, provenant des choix qui ont été faits au cours de leur développement. En premier temps, l'ajout tardif d'IDMS provenant de cultures de levures ne permet pas de prendre en compte le rendement d'extraction. Afin d'améliorer ce point, il serait intéressant de développer un IDMS provenant de cultures de cellules mammifères, comme la lignée cellulaire CHO. On obtiendrait ainsi un IDMS au profil métabolomique similaire aux échantillons murins, voir humains. Cela pourrait permettre l'utilisation d'un seul ratio d'IDMS pour toutes les analyses, et donc de l'ajouter au plus tôt dans l'extraction. Cela pourrait cependant s'avérer onéreux. En effet, les bactéries ou les levures peuvent proliférer sur glucose comme seule source de carbone. L'ajout de ^{13}C -glucose est donc suffisant pour produire un IDMS à partir de ces organismes. Les cellules mammifères, quant à elles prolifèrent dans des milieux de cultures complexes, composés notamment de glucose, de différents acides aminés, de vitamines et de sérum. Composer un milieu de culture pour des cellules mammifères nécessite donc l'apport de différentes molécules marquées au C13. Utiliser un IDMS mammifère permettrait également d'améliorer les gammes de standards, afin de permettre la quantification absolue d'un plus grand nombre de composés. Les quantifications seront alors absolues, et les caractérisations des tissus naïfs de souris NSG en seront affinés.

Bien que nous ayons validé les analyses sur la base de trois critères, nous aurions également pu analyser des échantillons contrôles, dit QC (pour contrôle qualité). Il s'agit généralement d'un mélange de l'ensemble des échantillons utilisé comme échantillon de référence, qui sera injecté tout au long de la séquence d'analyse. Cela permet d'avoir un suivi de la qualité des échantillons complémentaire aux critères utilisés dans ce travail, notamment pour le suivi de l'évolution de la colonne au cours de la séquence analytique. L'utilisation d'IDMS est une alternative aux QC qui permet de suivre l'évolution de la colonne à chaque échantillon, réduisant ainsi le temps d'analyse des séquences.

Ensuite, nous avons fait le choix d'utiliser des méthodes d'analyse non ciblées, couplées à des méthodes de retraitement ciblées. Cela peut paraître contre-intuitif, puisque le gain d'informations apporté par des méthodes d'analyses non ciblées est perdu en ciblant le retraitement. Pour ce premier projet, nous tenions à établir la faisabilité des méthodes et à caractériser les tissus naïfs des souris NSG. Procéder ainsi nous a permis de décrire les concentrations d'une cinquantaine de métabolites impliqués dans des voies majeures du métabolisme et nous donne la possibilité d'explorer ensuite le reste du métabolisme central.

RESULTATS

Enfin, bien que les méthodes proposées nous permettent d'étudier les principales voies du métabolisme, nous avons fait le choix de ne pas étudier les lipides. Afin de combiner ces méthodes avec des méthodes de lipidomique, deux solutions sont possibles. Tout d'abord, il est faisable d'utiliser une extraction triphasique, en ajoutant du chloroforme (CHCl_3) dans le solvant d'extraction. Les composés polaires seraient obtenus dans la phase aqueuse ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$), tandis que les lipides seraient concentrés dans la phase organique (CHCl_3). Certains métabolites sont cependant solubles dans les deux phases, signifiant qu'il y aurait un biais majeur dans l'analyse. Ajouter l'IDMS en amont de l'extraction permet de résoudre ce problème, mais comme discuté précédemment, nous n'avons pas pu procéder de la sorte. Ensuite, il est possible d'effectuer deux extractions indépendantes du même tissu. Bien que nous ayons fait le choix de ne pas le faire ici, il sera intéressant d'explorer cette possibilité par la suite, afin de compléter les profils métaboliques avec ces classes de métabolites.

En conclusion, les méthodes développées, bien que possédant leurs propres limites, nous permettent la quantification relative, voire absolue d'une cinquantaine de métabolites dans une dizaine de tissus murins. Grâce à elles, nous avons pu déterminer des profils métaboliques fiables des tissus murins dans plusieurs conditions : souris naïves, souris xénotreffées avec des cellules leucémiques et souris xénotreffées et traitées avec la cytarabine. Dans la prochaine partie sont détaillés ces profils métaboliques et les résultats obtenus.

RESULTATS

Chapitre II – Etude métabolomique des systèmes métaboliques tissulaires et plasmatiques prédictifs de l'activité mitochondriale des LAM *in vivo*

Contexte

Notre équipe et d'autres ont pu démontrer ces dernières années l'importance de l'étude du métabolisme dans le cadre des cancers et spécifiquement dans le cadre des résistances aux traitements dans les LAM. Le métabolisme mitochondrial et l'utilisation des nutriments alimentant ce métabolisme jouent un rôle majeur dans la résistance aux traitements. Afin d'éradiquer la maladie résiduelle et empêcher les rechutes chez les patients, de nouvelles approches sont nécessaires, notamment des études plus approfondies de l'hétérogénéité tumorale ou l'étude de l'implication du microenvironnement. Il apparaît de plus en plus que les LAM ont la capacité de coloniser des organes distants de la moelle osseuse. Certains articles explorent déjà cela et démontrent des mécanismes mis en place dans le foie³⁵⁷ ou le tissu adipeux³⁵⁸ par les cellules leucémiques. Elles acquièrent alors une chimiorésistance accrue, en particulier grâce à une production accrue de lipides par les cellules environnantes en présence de blastes leucémiques. Malgré ces observations, peu d'études explorent le métabolisme systémique de l'organisme. Dans ce projet, nous avons appliqué les méthodes décrites précédemment à deux modèles de xéno greffe de lignées cellulaires (MOLM14 : modèle chimiorésistant et U937 : modèle sensible) dans des souris NSG, afin d'explorer les mécanismes mis en place au sein de l'organisme entier.

Résultats majeurs

Dans cet article, nous avons caractérisé les tissus des souris NSG naïves, incluant les concentrations relatives ou absolues d'une cinquantaine de métabolites au sein des 10 tissus. Cela nous a permis de définir l'état basal des métabolomes des souris NSG qui sert ainsi de référence pour ce modèle murin.

Ensuite, nous avons pu déterminer que la présence de cellules leucémiques chez la souris NSG entraînait des changements tissulaires et systémiques dépendants de la lignée injectée. La xéno greffe de la lignée MOLM14 entraîne peu d'impact sur les profils métaboliques des différents tissus, contrairement à la lignée U937 dont la présence induit une modulation majeure des profils métaboliques tissulaires.

Nous avons ensuite caractérisé les changements induits par un traitement à l'AraC. Dans le modèle résistant (xéno greffe de MOLM14), à l'exception de quelques changements spécifiques dans les tissus pris en greffes (en particulier les métabolites liés à l'utilisation de l'aspartate), nous n'observons que peu de changements. Le modèle sensible (xéno greffe de U937), quant à lui, inverse les changements observés. Les profils sont alors similaires à ceux d'une souris naïve, ce qui peut s'expliquer par la

RESULTATS

réduction majeure de la prise en greffe des souris suite au traitement. Quelques changements sont encore observés, notamment dans la moelle osseuse et la rate, qui seront intéressants à explorer dans le futur.

Enfin, nous avons émis l'hypothèse qu'il était possible d'identifier des signatures métaboliques systémiques et caractéristiques de la lignée injectée. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux profils métaboliques du plasma. Nous avons identifié une signature, principalement composée des intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs, ainsi que les nucléotides, qui discrimine les deux xénogreffes en fonction du type métabolique basal (profil « high ou low OxPHOS ») des cellules injectées. Nous avons renforcé cette signature en établissant les profils métaboliques plasmatiques de plusieurs autres modèles CLDX et PDX. Grâce à des analyses transcriptomiques, nous avons défini le statut mitochondrial des cellules injectées et séparé les modèles en deux groupes « high ou low OxPHOS ». La signature métabolique qui permet alors de discriminer ces deux groupes est très similaire à celle obtenue précédemment. En résumé, les métabolites du cycle de Krebs caractérisent un statut « high OxPHOS », tandis que les intermédiaires de la glycolyse et les nucléotides caractérisent un statut « low OxPHOS ». Nous en avons conclu qu'il est possible de caractériser au sein du plasma d'une souris le statut mitochondrial des cellules leucémiques injectées.

Discussion et conclusion

Profils métaboliques des tissus naïfs

Dans un premier temps, la caractérisation métabolique des tissus naïfs permet d'établir une référence qui, à ce jour, manque dans la littérature. En effet, à ma connaissance, à part les profils métaboliques non ciblés d'une dizaine de tissus de deux souris C57BL/6 mâles, aucun profil métabolique des tissus murins naïfs n'a été décrit. La plupart des études se concentre sur les changements observés entre deux conditions, souvent avec et sans un traitement. Or, afin de comprendre au mieux ces changements, il est nécessaire de comprendre l'état naïf de ce même tissu. Par exemple, une étude a pu établir que l'utilisation du glucose dans un organisme leucémique était différente par rapport à un organisme sain (Ye et al. 2016). La présence de blastes dans les tissus adipeux ou les intestins entraîne une diminution de la production d'insuline, et le glucose est utilisé principalement par les cellules leucémiques, au détriment des principaux tissus consommateurs comme le foie ou le muscle. L'augmentation des intermédiaires de la glycolyse dans la moelle osseuse et le sang du modèle de xénogreffe de cellules U937, au détriment du foie, tissu adipeux et muscles pourrait être expliquée par cela. On peut cependant observer que les intermédiaires de la glycolyse sont également diminués au sein de la rate, organe colonisé par les cellules U937 et dans lequel nous devrions voir une augmentation de ces métabolites, si l'hypothèse précédente s'avérait juste. Pourrait-on expliquer cela

par le fait que la rate possède déjà, à l'état naïf, des quantités très importantes de ces métabolites ? La diminution observée serait-elle alors représentative des cellules saines d'un organe consommateur qui, par la régulation par la réponse insuline, diminue sa consommation ? Des expériences de marquage isotopique *in vivo* ou de métabolomique sur cellules triées pourraient potentiellement répondre à ces questions.

A l'avenir, il serait intéressant d'inclure les profils lipidiques pour être le plus exhaustif dans la caractérisation de ces tissus. De même, une analyse non ciblée, permettant d'inclure le maximum de métabolites, serait également intéressante pour comprendre la distribution des métabolites au sein des tissus et caractériser quelles voies métaboliques sont majoritairement utilisées dans chacun des tissus. Dans le cadre des leucémies, il serait également intéressant de caractériser les profils d'autres tissus, comme le cerveau, la peau ou les ganglions lymphatiques, trois principales zones de métastases. Tout cela permettrait d'offrir une connaissance détaillée des modèles que l'on utilise au quotidien dans nos études.

Les profils métaboliques obtenus dans cette étude ont été faits sur tissu entier. Les quantités de métabolites mesurées représentent alors la somme des quantités intracellulaires et de celles disponibles dans les fluides interstitiels des organes. Afin de connaître la disponibilité exacte des nutriments pour les cellules leucémiques dans chaque organe, il serait intéressant de séparer les cellules des fluides interstitiels. Quelques études ont déjà été faites à ce sujet, notamment dans les LAM³²⁰ et le cancer du pancréas^{359,360}. Les profils de ces fluides sont très différents de ceux du plasma sanguin ou des cellules cancéreuses. A l'interface entre les différentes populations d'un tissu, ce fluide renferme les données d'interactions intercellulaires et son étude permettrait de comprendre quels mécanismes métaboliques peuvent être mis en place. D'autres articles étudient le protéome de ces fluides^{361,362}, soit en faisant éluer les fluides dans un tampon salin, soit en centrifugeant les échantillons de tissu. J'ai tenté d'isoler par centrifugation les fluides interstitiels de la moelle osseuse et de la rate, car cette technique est exécutable en quelques minutes, contre quelques heures pour la méthode d'éluion. Ces tissus étant cependant denses, il est compliqué d'obtenir une quantité analysable et non contaminée par des cellules. Afin d'obtenir des échantillons représentatifs des fluides interstitiels, des méthodes de centrifugation sont possibles, mais à optimiser pour choisir les paramètres causant le moins de dommage aux cellules et étant les plus rapides à appliquer.

RESULTATS

Modulations des profils métaboliques tissulaires et systémiques suite à une xénogreffe et un traitement à l'AraC

Nous avons pu démontrer que la xénogreffe de cellules leucémiques au sein d'un modèle murin, ainsi que les traitements à l'AraC, impactaient les profils métaboliques des 10 tissus étudiés. Cela donne les arguments pour une étude plus ciblée de ces organes. En effet, bien que nous sachions aujourd'hui que les tissus sont impactés dans leur globalité, nous n'avons pas d'information sur les populations qui sont réellement impactées. Est-ce que ces changements résultent d'une reprogrammation systémique qui soutient les cellules leucémiques dans leur résistance ? Les tissus sains sont-ils réellement impactés ou voyons-nous des changements sur les populations de blastes nichées dans ces organes ? L'AraC induit-il ces effets sur les tissus murins de façon directe ? Pour cela, nous sommes en train d'évaluer par qPCR la prise en greffe de chaque organe. Cela nous permettra d'évaluer si les changements observés sont corrélés à la présence de blastes dans les tissus. Nous sommes également en train d'analyser des tissus de souris naïves traitées à l'AraC. Cela nous permettra de connaître l'effet direct du traitement sur les tissus sains. A partir de ces résultats, nous pourrons discriminer les effets intrinsèques à l'AraC de ceux qui sont induits par la présence de blastes. Par exemple, nous observons dans la plupart des tissus une augmentation du glutamate, méthionine et glycine. Ces métabolites sont les précurseurs de la synthèse de glutathion. Il est probable que l'AraC, qui induit un stress oxydatif conséquent, entraîne de lui-même ces changements dans les tissus sains. Cela nous permettra alors de discriminer les effets métaboliques secondaires de l'AraC sur l'organisme de ceux induits par la résistance. Ces deux études font partie de la révision de l'article.

Actuellement, des techniques innovantes (métabolomique sur cellules triées³⁶³⁻³⁶⁶, imagerie par spectrométrie de masse^{367,368}, métabolomique à l'échelle de la cellule unique³⁶⁹) émergent, bien qu'elles soient encore balbutiantes. Les principales limites actuelles de ces méthodes sont : 1) l'altération artéfactuelle du métabolisme, notamment celui de la régulation des ROS à travers l'utilisation de laser pour trier les cellules³⁶⁶, 2) l'instabilité des métabolites étudiés, rendant compliquée l'analyse de métabolites qui sont rapidement métabolisés comme les intermédiaires du cycle de Krebs, et 3) les très faibles taux de métabolites présents dans une cellule, qui rend difficile l'identification par spectrométrie de masse.

Nous pourrons alors dans les années suivantes, une fois ces techniques optimisées, décrire de façon plus détaillée le rôle des métabolismes tissulaires et systémiques dans la résistance aux traitements. Ces méthodes pourront certainement explorer les questions suivantes : Quelles populations présentes dans les microenvironnements tissulaires sont impactées par la leucémie ? Par l'AraC ? Quelles interactions peuvent être décrites entre leucémie et microenvironnement ? Existe-t-il une hétérogénéité métabolique intra-tumorale ? Dans ce contexte, mon étude se positionne comme

descriptive. Nous avons établi les profils métaboliques des souris NSG naïves. Nous observons de nombreuses modulations des profils métaboliques tissulaires et systémiques, mais nous n'avons pas encore les outils pour disséquer les mécanismes qui sont à l'origine de ces changements. Ces profils métaboliques encourageront, je l'espère, l'exploration des interactions entre leucémie et organisme à l'aide des techniques émergentes, afin d'identifier des cibles thérapeutiques au sein du métabolisme tissulaire et systémique.

Identification de biomarqueurs du statut métabolique de la tumeur et de sa réponse à l'AraC

Dans cet article, nous avons également proposé une signature métabolique plasmatique de l'activité mitochondriale des cellules injectées. Cette signature est renforcée par un article de 2014³³⁵ qui décrit des taux plasmatiques de 6 métabolites de la glycolyse et du cycle de Krebs comme un facteur pronostic indépendant dans les LAM. Ce résultat est pour moi le plus prometteur de mon projet. Comme discuté dans l'introduction, la résistance à certains traitements, comme l'AraC ou les inhibiteurs de IDH^m, est connectée à l'activité mitochondriale des cellules leucémiques du patient. De nombreux inhibiteurs de l'activité mitochondriale sont également en phase d'essai clinique. Comprendre le statut métabolique d'une leucémie grâce à des marqueurs obtenus de façon peu invasive chez le patient permettra très certainement de revisiter la classification cytogénétique actuelle des LAM et d'affiner la prise de décision sur le choix de la thérapie utilisée.

Afin d'exploiter ce genre de signatures en clinique, de nombreuses études sont cependant encore à effectuer. Tout d'abord, il est nécessaire d'évaluer la validité de cette signature chez les patients, en analysant leur plasma. Les signatures obtenues ici permettent de discriminer des modèles précliniques, très différents d'un point de vue métabolique de l'humain. L'article de 2014 laisse cependant présager qu'il est possible d'obtenir cette signature chez les patients. Ensuite, une fois cela fait, il faudra alors définir clairement la signature utilisée en clinique. Pour cela, des méthodes analytiques adaptées à la clinique (répétabilité, robustesse, intervalles de confiance...) sont nécessaires. Il sera peut-être également nécessaire de réduire cette signature à un panel de métabolites-clés, afin de diminuer les coûts et les temps d'analyses, et ainsi rendre cette analyse accessible à tous. Enfin, il serait intéressant d'identifier des signatures métaboliques de la résistance à d'autres traitements clés, comme le Venetoclax et ses différentes combinaisons (AraC ou Azacytidine). Cela permettrait alors d'identifier un panel complet de métabolites à analyser pour la meilleure personnalisation du traitement possible. Cela est à mon sens la clé des thérapies ciblées : prédire et contrer par le traitement adapté.

RESULTATS

Article soumis

***In vivo* metabolomic study uncovers distinct metabolic phenotypes of host tissues and predicts oxidative state of acute myeloid leukemia**

Guillaume Cognet^{1,2,3}, Lucille Stuanj^{1,2,3}, Thomas Farge^{1,2,3}, Mathilde Gotanègre^{1,2,3}, Maud Heuillet⁴, Lara Gales⁴, Amandine Rocher⁴, Nina Lager-Lachaud⁴, Claudie Bosc^{1,2,3}, Marie Sabatier^{1,2,3}, Estelle Saland^{1,2,3}, Ambrine Sahal^{1,2,3}, Laura Poillet-Perez^{1,2,3}, François Vergez^{1,2,3,5}, Véronique de Mas^{1,2,3,5}, Christian Récher^{1,2,3,5}, Floriant Bellvert⁴, Jean-Charles Portais^{4,5*}, Jean-Emmanuel Sarry^{1,2,3,*}

¹Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Université de Toulouse, Inserm, CNRS, Toulouse, France

²LabEx Toucan, Toulouse, France

³Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer 2018, Toulouse, France

⁴MetaToul-MetaboHUB, National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics, Toulouse, France

⁵RESTORE, Inserm U1301, UMR CNRS 5070, U. Paul Sabatier, EFS, Toulouse, France

⁵IUCT-Oncopole, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

*These authors contributed equally.

Correspondence: jean-emmanuel.sarry@inserm.fr; jean-charles.portais@inserm.fr;

Running Title: Metabolic niche and biomarker

Abstract

Background: Metabolic adaptation is a hallmark of cancer including acute myeloid leukemia (AML). Tumor microenvironment is also described as an essential support of leukemic metabolism. We explored how systemic and tissue metabolism was rewired in leukemia-bearing mice and upon chemotherapy.

Methods: Using AML cell line- and primary patient-derived xenograft models, we developed *in vivo* metabolomics to uncover the metabolic pattern of 10 tissues including plasma, bone marrow, spleen, liver, adipose tissue, lung, pancreas, kidney, heart and muscle.

Results: *In vivo* targeted mass spectrometry allowed metabolic characterization of tissues from naïve and AML-xenografted immunocompromised mice. AML xenotransplantation and cytarabine treatment induced AML cell type-dependent global changes in tissue metabolomes. Infiltration of high OxPHOS MOLM14 cells that are intrinsically chemoresistant, induced minor changes in tissue metabolomes. In contrast, low OxPHOS U937 xenograft led to major reprogramming of metabolic tissue niches for survival upon chemotherapy. Interestingly, plasma metabolite signatures could predict the oxidative phenotype of leukemic cells.

Conclusion: Major metabolic changes in host tissues play a crucial role in tumor xenotransplantation and define their OxPHOS state in AML. Since mitochondrial phenotype is an essential determinant of drug response in AML, plasma metabolite signatures might be novel biomarkers for patient stratification.

Keywords: *in vivo* metabolomics, metabolic niche, OxPHOS state, prediction, leukemia

Background

Since the discovery of the Warburg Effect, it was widely considered that cancer cells sustain reprogrammed metabolism, allowing them to face stressful challenges such as hypoxia, chemotherapy or metastasis¹⁻³. In this context, we and others have shown that enhanced oxidative phosphorylation (OxPHOS) activity and mitochondrial adaptation are major components of drug response in multiple cancers including acute myeloid leukemia (AML)⁴⁻⁸. The availability of various nutrients is needed to support this enhanced mitochondrial activity. Tumor microenvironments play a crucial role in this process by supplying cancer cells with glucose, amino acids and fatty acids⁹⁻¹⁵. In AML, leukemic cells are able to migrate through diverse microenvironments and colonize chemoprotective niches, other than hematopoietic organs, leading to the emergence of extramedullary disease (EMD), metastatic-like situations and poor prognosis¹⁶⁻¹⁹.

To study the role of the tumor microenvironment in metabolic adaptations, mouse models are widely used²⁰. They provide the systemic environment essential for better understanding of cancer biological characteristics such as engraftment, angiogenesis, metastasis, immunoresponse or drug systemic metabolization²¹⁻²³. From transgenic mice harboring murine cancer to humanized mice, many models have been developed. One of the most frequently used murine model is the highly immunodeficient NOD/SCID-IL2rg (NSG) mice xenografted with cell lines or primary cells²⁴⁻²⁷. Due to its enhanced immunodeficiency, this model allows optimal engraftment and proliferation of human cancer cells²⁶. This model has been exhaustively described from an anatomic, histologic and hematological point of view^{23,28}. Surprisingly, to our knowledge, little is known about metabolic profiles of tissues from diverse murine strains including NSG. Only one study described tissue metabolomes from two naïve male C57BL/6²⁹, and several works showed tissue metabolic rewiring^{13,30,31} and plasma metabolomes^{13,32}.

Furthermore, the impact of metabolite availability on studied phenotypes has become a major question in metabolomic studies³³⁻³⁶. For instance, uric acid was found to have a critical role in the inhibition of *in vivo* 5-fluoroacid treatment on sarcomas³⁶. While this metabolite is abundant in human plasma, it is not found in murine models, and the study of this treatment has strong limitations *in vivo*. Thus, describing the metabolic state of naive mouse niches is essential for the complete understanding of metabolic reprogramming and flexibility of cancer cells *in vivo*.

Here, we described metabolic profiles of polar metabolites from ten tissues of interest (*i.e.* plasma, bone marrow, spleen, liver, subcutaneous white adipose tissue or SWAT, lung, pancreas, kidney, heart and muscle) in naïve NSG mice. We further showed changes in tissue metabolism induced by either leukemic engraftment or cytarabine (AraC) treatment, and demonstrated that metabolic features of injected AML cells were drivers of tissue metabolic

rewiring *in vivo*. We also unraveled plasma signatures of the metabolic state of AML cells. Altogether, this study provides knowledge about metabolic profiles of NSG mice tissues and a better understanding of the systemic metabolic reprogramming following leukemic engraftment and AraC treatment. Finally, our results proposed plasma metabolic signature of AML mitochondrial state as novel biomarkers predictive of drug response in AML.

Methods

Primary samples and ethical statement. Primary samples were isolated from patient peripheral blood by Ficoll gradient separation and stock in liquid nitrogen until further use. Primary AML patient cells from peripheral blood have been collected during routine diagnostic procedures at the Toulouse University Hospital (TUH), after informed consent and stored at the HIMIP collection (BB-0033-00060). According to the French law, HIMIP collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and obtained a transfer agreement (AC 2008-129) after approbation by the “Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II” (ethical committee). Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (“Comité National Informatique et Libertés”; i.e. “Data processing and Liberties National Committee”). Peripheral blood and bone marrow samples were frozen in fetal calf serum with 10% DMSO and stored in liquid nitrogen.

Mice and mouse xenograft model. Animals were used in compliance with a protocol reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Région Midi-Pyrénées (France). NOD/LtSz-SCID/IL-2R γ chainnull (NSG) mice were produced at the Genotoul Anexplo platform at Toulouse (France) using breeders obtained from Charles River Laboratories. Mice were housed in sterile conditions using high-efficiency particulate arrestance filtered microisolators and fed with irradiated food and sterile water. AML cell lines and human primary AML cells were transplanted as reported previously^{4,24}. Briefly, mice (7-8 weeks old) were sublethally treated with busulfan (20 mg/kg) 24 hours before injection of leukemic cells. AML cell lines were washed in PBS, resuspended in 200 μ L Hank’s Balanced Salt Solution (HBSS) at a final concentration of 0.5 and 2x10⁶ cells (for resp. U937 and MOLM14) and injected into tail vein.

For leukemia patient samples, cells were thawed at room temperature, washed twice in PBS, resuspended in 200 μ L HBSS at a final concentration of 0.2-10x10⁶ cells and injected into tail vein. Transplanted mice were treated with antibiotic (Baytril) for the duration of the experiment. Daily monitoring of mice for symptoms of disease (ruffled coat, hunched back, weakness, and reduced mobility) determined the time of killing for injected animals with signs of distress. If no signs of distress were seen, mice were considered engrafted after a week for cell lines or were initially analyzed for engraftment after 8 weeks for patient samples except specified otherwise.

***In vivo* mice treatment.** After engraftment (1 week for cell line-derived xenografts or CLDX; 8 to 18 weeks as determined by flow cytometry on peripheral blood or bone marrow aspirates for patient-derived xenografts or PDX), NSG mice were treated with AraC. NSG mice were treated by daily intraperitoneal injection of 30 mg/kg AraC (60 mg/kg for PDX) for 5 days. AraC was kindly provided by the pharmacy of the TUH. For control, NSG mice were treated daily with intraperitoneal injection of vehicle, PBS 1X. Mice were monitored for toxicity and provided nutritional supplements as needed.

Assessment of leukemic engraftment. Assessment of leukemic engraftment was measured as reported previously. Briefly, NSG mice were humanely killed in compliance with European ethics protocols. Bone marrow (mixed from tibias and femurs) and spleen were dissected in a sterile environment and flushed in HBSS with 1% FBS. Mononuclear cells isolated by tissue lysis with NH₄Cl from bone marrow, and spleen were labeled with hCD33-PE (555450), mCD45.1-PerCP-Cy5.5 (156058), hCD45-APC (5555485), and hCD44-PECy (7560533) (all antibodies from BD Biosciences) to determine the fraction of human blasts (hCD45+mCD45.1-hCD33+hCD44+ cells) using flow cytometry. All antibodies used for cytometry were used at concentrations between 1/50 and 1/200 depending on specificity and cell density. Analyses were performed on a CytoFLEX flow cytometer with CytoExpert software (Beckman Coulter) and FlowJo 10.2 (Tree Star). The number of AML cells/ μ l peripheral blood and number of AML cells in total cell tumor burden (in bone marrow and spleen) were determined by using CountBright beads (Invitrogen) using described protocol.

Tissue sampling for metabolomics. Plasma samples were isolated from peripheral blood of mice, collected prior to the sacrifice. After centrifugation (@3000rpm, 5min, @4°C), plasma supernatant was collected and fast-frozen in liquid nitrogen.

Tissues samples were collected in this order: spleen, pancreas, kidney, liver, lung, heart, subcutaneous adipose tissue, muscle and bone marrow. After weighting, all tissues were fast-frozen in liquid nitrogen. Spleen and bone marrow samples were halved in order to simultaneously perform the leukemic engraftment analysis. Tissue collection from mouse sacrifice to fast-freezing was done within 5 minutes. All samples were stored at -80°C until further use.

Metabolite profiling. A volume of 10-50 μ L of plasma were thawed for extraction. Milli-Q water was added q.s. 100 μ L. 400 μ L of cold methanol were then added for extracellular matrix precipitation. After thorough mixing and incubation at -20°C for 15min, samples were centrifuged (@2000g, 5min, @4°C) and supernatant was recovered. 35 μ L of isotope dilution method standard solution³⁷ was added to 125 μ L of extract, dried using the Eppendorf

Concentrator 5301 and resuspended into 60µL Milli-Q water. Two 30µL vials were prepared for central metabolites and amino acids analyses.

Solid tissues were first homogenized in cold conditions using a tissue lyser, with three 1-minute cycles at 25Hz and 5-10mg of homogenized tissue were weighed. 750µL of acetonitrile/methanol/Milli-Q water (2:2:1) + 0.1% formic acid were added to the samples. The resulting pellets were then lysed with two 1-minute cycles at 25Hz. After incubation at -20°C for 15min, samples were centrifuged (@2000g, 5min, @4°C) and supernatant was recovered. Isotope dilution method standard solution was added to the extract (35µL for 1000µL of extract for central metabolites analysis; 25µL for 75µL of extract for amino acids analysis), dried using the Eppendorf Concentrator 5301 and resuspended into 50µL Milli-Q water. Metabolites were quantified using methods described previously³⁸, using the TraceFinder 4.1 software, operating under Xcalibur 4.1 (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX).

Single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA). The transcriptomes of 35 primary samples were analyzed using the ssGSEA module of the GenePattern website³⁹. Obtained enrichment scores for OXPHOS signatures were normalized with a z-score.

Principal Component Analysis (PCA). Plasma datasets of metabolite concentrations were normalized to the naïve mice plasma and transformed into logarithm 10. The PCA was computed using the R package mixOmics⁴⁰.

Statistical analyses. Statistical analyses were conducted using Prism software v9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was determined by the two-tailed unpaired Student's t-test. A pvalue < 0.05 was considered statistically significant. For all figures, ns- not significant, *p%0.05, **p%0.01, ***p%0.001, ****p%0.0001. Unless otherwise indicated, all data represent the mean ± standard error of the mean (SEM) from at least three independent experiments.

Results

Metabolic pattern is markedly different between the tissues of naive NSG mice. To understand how the xenotransplantation of human AML cells rewire tissue metabolism, we first characterized the metabolic profiles of ten different tissues (plasma, bone marrow (BM), spleen (SP), liver, subcutaneous white adipose tissue (SWAT), pancreas, lung, kidney, heart and muscle) from 4 naïve 8 weeks-old male and female NSG mice (Fig. 1a). Using two complementary LC-MS methods, 48 metabolites were quantified in absolute or relative amounts in each tissue. The measured metabolites were representative of the major metabolite classes (e.g. phosphorylated sugars, organic acids, amino acids (AA), nucleotides), and covered central and energy metabolic pathways (glycolysis, pentoses-phosphate pathway, TCA cycle and related processes, amino acid metabolism, nucleotide metabolism). Metabolic profiles of plasma from the naïve mice showed high levels of amino acids (range from 0.1 to 1mM), especially valine, glutamine, glycine and alanine. AA are key components of metabolism, as they constitute the main product of digested proteins and can be fuels for energy and biomass production. In contrast, other metabolites (glycolytic and TCA cycle intermediates, nucleotides and phosphorylated sugars) were observed in lower concentrations (range from 0.1 to 1.0 mM) (Fig. 1b). We were able to compare AA concentrations in NSG plasma with the data found in the MMMDB²⁹ and observed that they were found in similar ranges. Other metabolites could not be compared.

Due to the vast range of concentrations in central metabolites in the different solid tissues, we normalized metabolite concentrations using a z-score (Fig. 1c). AA absolute amounts were also graphed in the different tissues (Additional Fig. 1a). Overall, most tissues had similar profiles, with the exception of two peculiar tissues (SWATs and SP). SWATs were characterized by the lowest metabolites concentrations and SP showed high levels in AA, early glycolytic intermediates and phosphorylated sugars. Low amounts of metabolites were expected in SWATs, as they are the major lipid reservoir. Surprisingly, AA and glycolytic intermediates in SP was over-abundant in this tissue. The SP is a hematopoietic organ with cellular composition similar to that of the BM and the overabundance of nutrients in this organ might explain the high propensity of leukemic cells to engraft this tissue. Because of the differences in AA content in SP, we further assessed AA distribution and concentration in all tissues (Fig. 1d). AA distribution was found quite similar in most tissues, with the exception of SWATs, showing undetectable amounts of glycine, and plasma, showing the lowest amounts of aspartate. This indicates that proteinogenic amino acids balance is conserved in the different organs.

Since gender is one of intrinsic factor regulating host metabolism, we also wanted to evaluate the impact of sex on metabolic profiles (Additional Fig. 1b). To our knowledge, no study was done on this aspect, and significant changes could bias further results. Interestingly,

we found very few sex-specific changes in metabolite quantities in most tissues. The most impacted tissue was the BM with 6 amino acids (arginine, leucine, phenylalanine, serine, tyrosine and valine) significantly increased in female mice. We concluded that sex-driven changes were minimal in this cohort. Indeed, we studied 7-8 weeks-aged animals. These mice were at an early stage of puberty, indicating that sex-dependent metabolic impacts were minimized. Knowing that mice life span can extend to at least one year after cell engraftment for patient-derived xenografts, sex-driven metabolic changes would be uncovered at later stages.

AML xenotransplantation induces a profound reprogramming of local and systemic metabolism *in vivo*. We investigated the impact of leukemic engraftment on murine tissue metabolic profiles. NSG mice were engrafted with two metabolically different AML cell lines: high OxPHOS AraC-resistant MOLM14 cells and low OxPHOS AraC-sensitive U937 cells⁴. We have previously shown that the distribution of AML cells was variable in hematopoietic tissues of NSG mice post-transplantation²⁴. MOLM14 and U937 cells mostly invade BM and SP, respectively. After two weeks of transplantation, we sacrificed mice and assessed leukemic engraftment in these two hematopoietic tissues by flow cytometry (Additional Figure 2a-c). We confirmed significant differences in leukemic infiltration between MOLM14 and U937 cells. Other organs were not analyzed by cytometry, and possible engraftment could not be assessed. Then, metabolic profiles were done for the 9 solid tissues (Fig. 2a).

Metabolome of MOLM14-engrafted tissues showed little changes compared to their respective naïve metabolome. 24 metabolites were differentially changed mostly in BM (Fig. 2b). Asparagine, aspartate and phosphoenolpyruvate were depleted in MOLM14-engrafted mice, whereas glutamate, UMP, CMP, 2-hydroxyglutarate, galactosamine-1-phosphate (GalN-1P), N-acetylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1P) and N-acetylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6P) were accumulated. Changes were also observed in muscles with depletion of CMP, GMP, alanine, glutamate, glutamine, and pentoses-5-phosphate, in the pancreas with the depletion of GMP and pentoses-5-phosphate, in kidney with the depletion of glutamine and accumulation of ribose-1-phosphate, in the lung with an accumulation of UTP and glutamine, and in the heart with an accumulation of lactate and pentoses-5-phosphate (Fig. 2a).

On the other hand, U937 engraftment led to major changes in metabolic profiles compared to naïve tissue metabolome (Fig. 2c). Lung was the most impacted tissue with depletion of aspartate and glycine, and accumulation of AAs, fructose-1.6-biphosphate (FBP), fructose-6-phosphate (Fru6P), 2-hydroxyglutarate (2-HG), and derivatives of uridine. BM was characterized by depletion of aspartate, asparagine, glycine, GalN-1P and GlcNAc-1P, and accumulation of pyruvate, CMP and 2-HG from U937-xenografted mice. SP was characterized with depletion of aspartate, asparagine, serine, methionine, orotate, glucose-6-phosphate and

Fru6P. Liver showed depletion of succinate and GalN-1P, and accumulation of glutamate, phenylalanine and threonine, while pancreas was characterized by depletion of glutamine and sedoheptulose-7-phosphate (Sed7P), and accumulation of glutamate, branched chained AA (BCAA), tyrosine, phenylalanine and citrate & isocitrate. Pentose-5-phosphates, CMP and glutamate were depleted, and BCAA accumulated in muscles. Heart was significantly exhibited a depletion of serine, and an accumulation of BCAA, phenylalanine, 2-hydroxyglutarate, Sed7P and GlcNAc-6P. Finally, kidney showed depletion of glycine and alanine, and accumulation of UDP (Fig. 2c).

Importantly, comparing global metabolic profiles after the xenotransplantation of both AML cell lines *in vivo* showed the most changes (Fig. 2d). In brief, AA were accumulated in SP and kidneys of MOLM14-engrafted mice, whereas they were accumulated in the lungs, SWAT and pancreas of U937-engrafted mice. Glycolytic intermediates were accumulated in SP of MOLM14 xenografts and accumulated in lungs of U937 xenografts. This suggests that the metabolic impact of AML engraftment is mostly driven by the intrinsic characteristics of injected AML cells and their organ distribution (Fig. 2d). Of note, we also showed commonly affected metabolites in hematological tissues of both xenografts (BM of MOLM14 xenografted mice (Fig. 2e), and in both the BM and SP of U937 xenografted mice (Fig. 2f, 2g)). Aspartate, asparagine and orotate were depleted, whereas UMP and CMP were found accumulated in U937-xenografted tissues. Interestingly, these changes were not found in SP of MOLM14 CLDX (Fig. 2h). Since engraftment of MOLM14 cells in SP is too small (Additional Fig. 2b), this could indicate that this common modulation is in a blast-dependent manner. These biggest changes in metabolic pathways suggest a rewiring of aspartate metabolism in the nucleotide biosynthesis (Fig. 2i).

Cytarabine treatment modifies systemic metabolism in AML xenografted mice. To understand how chemotherapeutic agents might affect tissue metabolism of AML-engrafted mice, we treated mice with AraC (30 mg/kg/d), or its vehicle PBS for a week (Additional Fig. 2a). As previously described, chemotherapy did not induce any significant reduction of the total cell tumor burden in MOLM14-xenografted model, while it significantly reduced engraftment of U937 cells (fold-change of 13 and 276 in BM and SP, respectively; Additional Fig. 2b-c). Metabolic profiles of the 9 tissues of xenografted mice treated with AraC were performed as described above, with a normalization to the PBS-treated conditions (Fig. 3a).

MOLM14-engrafted mice treated with AraC showed modest modulations compared to PBS treatment (Fig. 3b). Those changes were mostly observed in SP with a net accumulation of AA after treatment (Fig. 3a). Lactate was increased after treatment in both SP and liver, and some nucleotides-related metabolites (orotate, cytidine monophosphate, guanosine diphosphate, and uridine triphosphate) were modulated in BM, SP, pancreas and heart. This

absence of global changes in tissue metabolomes after AraC treatment was also observed when comparing naïve mice and AraC-treated MOLM14-engrafted mice (Fig. 3c). In addition, metabolic changes were similar to the one observed by comparing vehicle-treated mice to naïve NSG (Fig. 3c *versus* Fig. 2b). However, additional changes were observed with an accumulation of galactosamine-1-phosphate (SP and lung), of orotate (kidney), and UDP (muscle), of BCAA (isoleucine, valine and phenylalanine), and pyrimidines (CMP and UMP) in heart.

Importantly, AraC-treated U937-xenografted mice were characterized by major metabolic changes (Fig. 3d). AA were globally accumulated in SP and liver, and depleted in pancreas and muscle. Some common difference in AA were seen in most organs, with an accumulation of aspartate, glutamate, glycine and serine. These AA can all fuel glutathione synthesis for reactive oxygen species (ROS) detoxification, suggesting that AraC treatment on this model globally impact ROS production and anti-oxidant defense. Glycolytic intermediates and phosphorylated sugars were accumulated in both muscle and lung. TCA cycle intermediates amounts were globally unchanged, with the exception of liver. In this tissue, succinate, fumarate and malate were accumulated, suggesting that AA such as glutamine, glutamate and aspartate were more fueled into energy production. Lastly, nucleotides were globally depleted in lung. All these changes led towards a 'naïve-like' condition, as tumor burden was greatly decreased upon AraC treatment (Additional Fig. 2b-c). When comparing AraC-treated U937-engrafted mice with naïve ones (Fig. 3e), most changes were reversed, with the exception of phosphorylated sugars, being depleted in SP and accumulated in BM and lung.

Of note, orotate pool was recovered in BM of both xenografted models and in SP of U937-engrafted mice post-AraC (Fig. 3f). AraC-treatment widely impact the energy metabolism and OxPHOS⁴, and dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) one of the enzymes involved in the biosynthesis of nucleotides from aspartate is also dependent on the electron flux by reduction of ubiquinone⁴¹. Accordingly, orotate accumulation could imply an increase of the electron transfer chain activity in the whole tissue. Interestingly, orotate was detected in two other organs, lung and kidney, and no significant changes were seen in these organs (Additional Fig. 2d). Therefore, this phenotype is only found in engrafted hematological tissues. Altogether, we proposed that intrinsically chemoresistant MOLM14 cells do not induce global change of tissue metabolomes, whereas U937 significantly undergo a massive decrease in tumor burden with a profound reprogramming in metabolomes back to a 'naïve-like' state.

Plasma LC-MS profiling experiment provides metabolic biomarkers of the oxidative phenotype of tumor *in vivo*. To assess whether plasma metabolome might reflect metabolic

signature of specific host tissues or/and AML, metabolic profiling of plasma was performed as described above for tissues (Fig. 4a). Except AA, level of all studied metabolites was changed post-xenotransplantation. TCA cycle intermediates were accumulated in MOLM14 xenograft and depleted in U937 xenograft. Glycolytic intermediates, nucleotides-related, and phosphorylated sugars were accumulated in U937 xenograft and depleted in MOLM14 xenograft. Since U937 and MOLM14 cells displays low and high OxPHOS dependency⁴, we hypothesized that plasma metabolic signatures might predict the oxidative state of AML tumors. We thus performed an unsupervised principal component analysis (PCA) of metabolomic data in the five conditions (naïve, MOLM14, U937, PBS or AraC; Fig. 4b), and found that 54% of the overall variation in plasma metabolic profiles allowed significant discrimination of the two types of AML xenograft with several metabolites as representative of each xenograft (Fig. 4a). These results suggest a specific signature of central metabolites as biomarkers of the metabolic state of the injected/xenografted AML cells.

To further explore this assumption, we analyzed a second independent cohort of mice (cohort 2), including 3 CLDX models (MOLM14, U937 or KG1a, another low OxPHOS AML cell line), and 8 different patient-derived xenograft (PDX) models (IM06, IM26, IM31, IM76, IM110, Ps325, Ps 6030 and Ps6312; Additional Table 2). Based on the transcriptome of primary patient AML blasts, the oxidative status of 4 PDX models (IM06, IM31, IM76 and Ps325) was characterized by single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) using curated OxPHOS gene signatures (Fig. 4c). Accordingly, Ps325 and IM31 were found to have a low OxPHOS status, whereas IM06 and IM76 display a high OXPHOS status. The plasma metabolic profiles of the cohort 2 were performed, and the results were normalized to the naive state as described in our first cohort (Fig. 4d). We then performed PCA on CLDX and PDX samples with known OxPHOS status, and found that 20% of the global variation allowed discrimination of plasma metabolomes according to the OxPHOS status of injected cells (Fig. 5e). When comparing the contributing metabolites for low and high OxPHOS status in both cohorts (Fig. 5f), we found 13 common metabolites accumulated in low OxPHOS CLDX and PDX models, including 2,3-diphosphoglycerate, 6-phosphogluconate, adenine mono/di/triphosphate, fructose-6-phosphate, guanosine mono-/di-phosphate, glucose-6-phosphate, mannose-6-phosphate, pentoses-5-phosphate and uridine mono/diphosphate. We also found 6 common metabolites accumulated in high OxPHOS CLDX and PDX models, including arginine, citrate/isocitrate, fumarate, lactate, malate and pyruvate. This indicates that this set of murine plasma metabolites might be predictive of the OxPHOS status of tumor cells.

Discussion

In this study, we aimed to study metabolic profiles of engrafted NSG mice tissues. We found two adaptive profiles specific of the engraftment and treatment. AraC-treated MOLM14

xenograft induced minimal changes in tissue metabolomes as similar as the untreated xenograft. This confirmed that MOLM14 cells are intrinsically primed for AraC resistance and they do not induce a global redirection of host metabolism to survive upon AraC treatment. As opposed, tissues of AraC-treated sensitive U937-xenografted mice underwent major metabolic reprogramming. This indicates that U937 residual cells largely rewire the host metabolism to sustain their proliferation and adaptation to AraC treatment. Glycolysis and energetic metabolism were changed in hematopoietic niches, suggesting an increase in the OxPHOS status in the murine microenvironment of these niches. Further, AraC treatment induced accumulation of methionine, serine and glycine in most organs of U937-xenografted mice. These three metabolites are mainly involved in ROS management through glutathione biosynthesis, folate cycle and transsulfuration pathway. It is known that AraC leads to an increase in ROS content *in vivo*, through enhanced OxPHOS status^{4,42}. An increase in these three metabolites in most organs support an adaptation of murine niches to this oxidative stress. Finally, we observed a depletion in glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate and mannose-6-phosphate after U937 engraftment in highly glycolytic muscle tissues. This suggest that glucose utilization in the muscle is highly diminished and hijacked by glycolytic U937 cells. This is consistent with another study that described the capacity of leukemic cells to rewire systemic glucose utilization through enhanced insulin resistance⁹, and suggests that highly glycolytic U937 cells are able to compete with distant muscle tissue for glucose utilization.

Changes in aspartate metabolism and nucleotide production were found common to both CLDX models. Aspartate, asparagine, orotate and phosphoenolpyruvate pools tended to be depleted, whereas CMP and UMP are increased in engrafted hematological tissues. This suggests that aspartate is specifically rewired in engrafted hematopoietic organs to sustain nucleotide production and proliferation as previously documented¹³. AraC treatment leads to replenishment of the orotate pool, favored by the enhanced OxPHOS status^{4,13}. Having a higher OxPHOS status upon treatment leads to accumulation of reduced ubiquinone in the electron transfer chain, which could be used for the repletion of the orotate pool, through the activity of mitochondrially bound DHODH. This could facilitate the proliferation of residual cells and relapse. DHODH inhibitors such as Brequinar are already being evaluated in clinical trials alone (NCT03760666), and mechanisms of action have already been published⁴³. Our study supports the rationale of a combination of AraC and DHODH inhibitor to slow down the appearance of relapses.

Importantly, we found that a set of plasma metabolites, including TCA cycle and glycolysis intermediates, could discriminate AML cells *in vivo* based on their oxidative status. While this metabolite set explains half of the variations in our feasibility analysis (with MOLM14 and U937 xenografts), it only explains a fifth of the variation in the second cohort (multiple CLDX and PDX models). Patient AML cells have a high genetic and metabolic heterogeneity⁴⁴.

CLDX and PDX engraftment time and tissue distribution can also widely vary^{24,45}. Thus, the finding of a common signature efficiently discriminating injected cells depending on their OxPHOS status is promising. Since OxPHOS status is tightly related to chemoresistance, plasma metabolic signatures might also represent relevant metabolic biomarkers for drug response in AML. Interestingly, previous work has shown that glycerol-3-phosphate, pyruvate, lactate, citrate, 2-HG and alpha-ketoglutarate concentrations in patient plasma constitute an independent factor of low response to AraC treatment⁴⁶. Most of these metabolites are markedly impactful in our metabolic signature from xenografted murine plasma. The OxPHOS status is described as critical to many drug resistances in AML^{4,11,42}. Accordingly, plasma is a tissue of interest for biomarker of the oxidative status of patient blasts to improve management of AML patients.

However, several limitations to our study should be taken into consideration, the main one being that mice were injected intravenously. The developed disease does not completely reconstitute leukemic appearance in patients. Some observed changes could be due to non-relevant colonization of distant tissues. Furthermore, our metabolomic studies were performed on bulk tissues. This did not distinguish metabolic changes in leukemic cells from those in the murine microenvironment within each tissue. Interstitial fluids could not be distinguished from the cells. Thus, metabolite amounts in naïve mice tissues do not correspond to the bioavailable amounts for leukemic cells. Techniques for interstitial fluid isolation are emerging and could be greatly useful for better understanding of dialogues between microenvironment and leukemic cells^{13,47}. A study of leukemic and microenvironmental sorted cells from these tissues could lead to further rewiring and dialogues observations that could be exploited for therapy. Finally, techniques such as single cell metabolomics (SCM)⁴⁸ or mass spectrometry imaging (MSI)^{49,50} could be useful, although they are not quite adapted for central metabolites analysis yet.

Conclusion

This study allows for a better understanding of the differential engraftment and therapy adaptation patterns of leukemic cells, and provides several important foundations for further *in vivo* metabolomic studies. This study also highlight plasma metabolic signatures as potential biomarkers of metabolic status of blasts and of therapy resistance.

Abbreviations

2.3-PG	2.3-diphosphoglycerate
2-HG	2-hydroxyglutarate
6-PG	6-phosphogluconate
ADP	Adenosine diphosphate
aKG	Alpha-ketoglutarate
Ala	Alanine

AML	Acute myeloid leukemia
AMP	Adenosine monophosphate
AraC	Cytarabine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartate
ATP	Adenosine triphosphate
BM	Bone marrow
Cis-Aco	Cis-aconitate
Cit & IsoCit	Citrate and Isocitrate
CLDX	Cell-line derived xenograft
CMP	Cytosine monophosphate
DHODH	Dihydroorotate dehydrogenase
EMD	Extra-medullar disease
ETC	Electron transport chain
Fru6P	Fructose-6-phosphate
FruBP	Fructose-1,6-bisphosphate
Fum	Fumarate
GalN-1P	Galactosamine-1-phosphate
GDP	Guanosine diphosphate
Glc6P	Glucose-6-phosphate
GlcNAc-1P	N-acetylglucosamine-1-phosphate
GlcNAc-6P	N-acetylglucosamine-6-phosphate
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
Gly	Glycine
Gly3P	Glycerol-3-phosphate
GMP	Guanosine monophosphate
His	Histidine
IDMS	Isotope dilution method standard
Ile	Isoleucine
LC-MS	Liquid chromatography – Mass spectrometry
Mal	Malate
Man6P	Mannose-6-phosphate
Met	Methionine
MMMDB	Mouse multiple tissue metabolome database
MSI	Mass spectrometry imaging
NSG mouse	Non-obese diabetic scid gamma mouse
OAA	Oxaloacetate
Oro	Orotate
OxPHOS	Oxidative phosphorylation
P5P	Pentoses-5-phosphate
PDX	Patient derived xenograft
PEP	Phosphoenolpyruvate
Phe	Phenylalanine
Pro	Proline
Pyr	Pyruvate
Rib1P	Ribose-1-phosphate
ROS	Reactive oxygen species
Sed7P	Sedoheptulose-7-phosphate
Ser	Serine
SCM	Single cell metabolomics
SP	Spleen
ssGSEA	Single sample gene set enrichment analysis
Suc	Succinate
SWAT	Subcutaneous white adipose tissue

TCA	Tricarboxylic acid
Thr	Threonine
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosine
UDP	Uridine diphosphate
UDP-AcGlcN	Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine
UMP	Uridine monophosphate
UTP	Uridine triphosphate

Acknowledgements

We thank Anne-Marie Benot, Muriel Serthelon and Stéphanie Nevouet for their daily help about the administrative and financial management of the Sarry lab. MetaTOUL (Metabolomics & Fluxomics Facilities, Toulouse, France, www.metatoul.fr) is part of the national infrastructure MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 (The French National infrastructure for metabolomics and fluxomics, www.metabohub.fr).

Funding

This work was also supported by grants from the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN and TOUCAN2.0; contract ANR11-LABEX), the Canceropole GSO (MetaboCancerGSO), La Ligue Nationale de Lutte Contre le Cancer, the Fondation ARC, the Fondation Toulouse Cancer Santé and the Association G.A.E.L. MetaToul is supported by grants from the Région Midi-Pyrénées, the European Regional Development Fund, the SICOVAL, the Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSa, France), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). G.C. has a fellowship from the Ligue Nationale de Lutte Contre le Cancer.

Declarations

Ethics approval

Animals were used in accordance with a protocol reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Région Midi-Pyrénées (France). NSG mice were produced at the Genotoul Anexplo platform at Toulouse, France, using breeders obtained from Charles River Laboratories. Mice were housed in sterile conditions using high-efficiency particulate arrestance filtered microisolators and fed with irradiated food and sterile water

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Pascual, G. *et al.* Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* **541**, 41–45 (2017).
2. Lien, E. C. *et al.* Glutathione biosynthesis is a metabolic vulnerability in PI(3)K/Akt-driven breast cancer. *Nat Cell Biol* **18**, 572–578 (2016).
3. Labuschagne, C. F., Cheung, E. C., Blagih, J., Domart, M.-C. & Vousden, K. H. Cell Clustering Promotes a Metabolic Switch that Supports Metastatic Colonization. *Cell Metab* **30**, 720-734.e5 (2019).
4. Farge, T. *et al.* Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov* **7**, 716–735 (2017).
5. Zacksenhaus, E. *et al.* Mitochondrial OXPHOS Induced by RB1 Deficiency in Breast Cancer: Implications for Anabolic Metabolism, Stemness, and Metastasis. *Trends Cancer* **3**, 768–779 (2017).
6. Cruz-Bermúdez, A. *et al.* Cisplatin resistance involves a metabolic reprogramming through ROS and PGC-1 α in NSCLC which can be overcome by OXPHOS inhibition. *Free Radic Biol Med* **135**, 167–181 (2019).
7. Sica, V., Pedro, J. M. B.-S., Stoll, G. & Kroemer, G. Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. *International Journal of Cancer* **146**, 10–17 (2020).
8. Roth, K. G., Mambetsariev, I., Kulkarni, P. & Salgia, R. The Mitochondrion as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. *Trends Mol Med* **26**, 119–134 (2020).
9. Ye, H. *et al.* Subversion of Systemic Glucose Metabolism as a Mechanism to Support the Growth of Leukemia Cells. *Cancer Cell* **34**, 659-673.e6 (2018).
10. Tabe, Y., Lorenzi, P. L. & Konopleva, M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. *Blood* **134**, 1014–1023 (2019).
11. Stuani, L., Sabatier, M. & Sarry, J.-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biol* **17**, (2019).
12. Mishra, D. & Banerjee, D. Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
13. van Gastel, N. *et al.* Induction of a Timed Metabolic Collapse to Overcome Cancer Chemoresistance. *Cell Metabolism* **32**, 391-403.e6 (2020).
14. Marine, J.-C., Dawson, S.-J. & Dawson, M. A. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat Rev Cancer* **20**, 743–756 (2020).

15. Stuani, L. *et al.* Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* **218**, (2021).
16. Akhaddar, A., Zyani, M., Mikdame, M. & Boucetta, M. Acute myeloid leukemia with brain involvement (chloroma). *Intern Med* **50**, 535–536 (2011).
17. Stölzel, F. *et al.* The prevalence of extramedullary acute myeloid leukemia detected by 18FDG-PET/CT: final results from the prospective PETAML trial. *Haematologica* **105**, 1552–1558 (2020).
18. Ye, H. *et al.* Leukemic stem cells evade chemotherapy by metabolic adaptation to an adipose tissue niche. *27* (2017).
19. Ye, H. *et al.* The Hepatic Microenvironment Uniquely Protects Leukemia Cells through Induction of Growth and Survival Pathways Mediated by LIPG. *Cancer Discov* **11**, 500–519 (2021).
20. Mendes, N. *et al.* Animal Models to Study Cancer and Its Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **1219**, 389–401 (2020).
21. Walsh, N. C. *et al.* Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annu Rev Pathol* **12**, 187–215 (2017).
22. Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E. T. & Patnaik, A. Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. *Cancer Discov* **8**, 1358–1365 (2018).
23. Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, J. V. & Greiner, D. L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* **12**, 786–798 (2012).
24. Saland, E. *et al.* A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* **5**, e297 (2015).
25. Tirado-Gonzalez, I. *et al.* CRISPR/Cas9-edited NSG mice as PDX models of human leukemia to address the role of niche-derived SPARC. *Leukemia* **32**, 1049–1052 (2018).
26. Okada, S., Vaeteewoottacharn, K. & Kariya, R. Establishment of a Patient-Derived Tumor Xenograft Model and Application for Precision Cancer Medicine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **66**, 225–230 (2018).
27. Nanni, P. *et al.* Bone sarcoma patient-derived xenografts are faithful and stable preclinical models for molecular and therapeutic investigations. *Sci Rep* **9**, 12174 (2019).
28. Layssol-Lamour, C. J., Sarry, J.-E., Braun, J.-P. D., Trumel, C. & Bourgès-Abella, N. H. Reference Values for Hematology, Plasma Biochemistry, Bone Marrow Cytology and Bone Histology of NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ Immunodeficient Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* (2020) doi:10.30802/AALAS-JAALAS-20-000020.

29. Sugimoto, M. *et al.* MMMDB: Mouse Multiple Tissue Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* **40**, D809-814 (2012).
30. Boyd, A. L. *et al.* Identification of Chemotherapy-Induced Leukemic-Regenerating Cells Reveals a Transient Vulnerability of Human AML Recurrence. *Cancer Cell* **34**, 483-498.e5 (2018).
31. Blomme, A. *et al.* Murine stroma adopts a human-like metabolic phenotype in the PDX model of colorectal cancer and liver metastases. *Oncogene* **37**, 1237–1250 (2018).
32. Beaudry, P. *et al.* A Pilot Study on the Utility of Serum Metabolomics in Neuroblastoma Patients and Xenograft Models. *Pediatr Blood Cancer* **63**, 214–220 (2016).
33. Yao, T. & Asayama, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol* **16**, 99–117 (2017).
34. Lagziel, S., Gottlieb, E. & Shlomi, T. Mind your media. *Nature Metabolism* **2**, 1369–1372 (2020).
35. Vande Voorde, J. *et al.* Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Sci Adv* **5**, eaau7314 (2019).
36. Cantor, J. R. *et al.* Physiologic Medium Rewires Cellular Metabolism and Reveals Uric Acid as an Endogenous Inhibitor of UMP Synthase. *Cell* **169**, 258-272.e17 (2017).
37. Wu, L. *et al.* Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards. *Anal Biochem* **336**, 164–171 (2005).
38. Scotland, S. *et al.* Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia* **27**, 2129–2138 (2013).
39. Reich, M. *et al.* GenePattern 2.0. *Nat Genet* **38**, 500–501 (2006).
40. Rohart, F., Gautier, B., Singh, A. & Lê Cao, K.-A. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput Biol* **13**, e1005752 (2017).
41. Madak, J. T., Bankhead, A., Cuthbertson, C. R., Showalter, H. D. & Neamati, N. Revisiting the role of dihydroorotate dehydrogenase as a therapeutic target for cancer. *Pharmacol Ther* **195**, 111–131 (2019).
42. Aroua, N. *et al.* Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov* **10**, 1544–1565 (2020).
43. Sykes, D. B. *et al.* Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Cell* **167**, 171-186.e15 (2016).
44. Horibata, S. *et al.* Heterogeneity in refractory acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 10494–10503 (2019).

45. Vick, B. *et al.* An advanced preclinical mouse model for acute myeloid leukemia using patients' cells of various genetic subgroups and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One* **10**, e0120925 (2015).
46. Chen, W.-L. *et al.* A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. *Blood* **124**, 1645–1654 (2014).
47. Terkelsen, T. *et al.* High-throughput proteomics of breast cancer interstitial fluid: identification of tumor subtype-specific serologically relevant biomarkers. *Mol Oncol* **15**, 429–461 (2021).
48. Duncan, K. D., Fyrestam, J. & Lanekoff, I. Advances in mass spectrometry based single-cell metabolomics. *Analyst* **144**, 782–793 (2019).
49. Buchberger, A. R., DeLaney, K., Johnson, J. & Li, L. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Anal Chem* **90**, 240–265 (2018).
50. Ferguson, C. N., Fowler, J. W. M., Waxer, J. F., Gatti, R. A. & Loo, J. A. Mass Spectrometry-Based Tissue Imaging of Small Molecules. *Adv Exp Med Biol* **1140**, 99–109 (2019).

Figure legends

Figure 1. Metabolic profiles of naïve immunodeficient NSG mice. (A) Experimental design and technical workflow. (B) Heatmap of the absolute concentrations of 38 metabolites in mice plasma. Amino acids were compared to C57BL/6 mice concentrations found in the MMMDB²⁹ (C) Tissue distribution of the 56 studies metabolites, normalized as z-scores. (D) Tissue distribution of amino acids in each tissue analyzed in this study. Undetected metabolites are colored white. n=3-4.

Figure 2. Cell Line Derived Xenograft (CLDX) models. (A) Experimental design. (B-C) Engraftment in the bone marrow and spleen of the two CLDX in millions of blasts (B) and percentage (C) of viable blasts. n=5-10, p-values calculated with Welsh statistical test.

Figure 3. AML xenograft modulates tissue metabolic profiles. (A) Heatmap of the relative quantification of 56 metabolites in every solid tissue after MOLM14 or U937 xenograft (normalized to the naïve condition, \log_{10}), p-values on the side show significance between the MOLM14 and U937 conditions. (B-C) Volcano plots showing the fold change (\log_2) ratio of all studied metabolites in every tissue of naïve vs. MOLM14 xenograft (B) and vs. U937 xenograft(C). (D) Volcano plot showing the fold change (\log_2) ratio of all studied metabolites in every tissue of the two xenografts. (E) Focus on the bone marrow metabolites modulations of the MOLM14 xenograft. (F) Focus on the bone marrow metabolites modulations of the U937 xenograft. (G) Focus on the spleen metabolites modulations of the U937 xenograft. (H) Aspartate metabolism is rewired in hematological tissues of xenografted mice. n=4-10, p-values calculated with Welsh statistical test.

Figure 4. Chemotherapy modulates tissue metabolic profiles of xenografted mice. (A) Heatmaps of the relative quantification of 56 metabolites in every solid tissue after AraC treatment in both xenografts (normalized to the control conditions, \log_{10}). (B-C) Volcano plots showing the fold change (\log_2) ratio of all studied metabolites in every tissue of MOLM14 xenografted mice, treated with PBS vs. ARAC (B), and the comparison of the naïve state with the residual disease (C). (D-E) Volcano plots showing the fold change (\log_2) ratio of all studied metabolites in every tissue of U937 xenografted mice, treated with PBS vs. ARAC (D), and the comparison of the naïve state with the residual disease (E). (F)Relative quantities of orotate in the bone marrow and the spleen; Metabolite[&]: Amino Acid method, *metabolite*[#]: ¹²C-metabolites areas, others: ¹²C/¹³C-metabolites ratios; n=4-10, p-values calculated with Welsh statistical test.

Figure 5. Plasma metabolic profiles unravel cell characteristic signatures and potential biomarkers. (A) Heatmap of the relative concentrations of 56 metabolites in the plasma (normalized to the naïve condition, \log_2); n=4-10. (B) PCA of all plasmas, representation of the first component, separating MOLM14 and U937 xenografted mice without treatment. (C) Heatmap of single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) of 4 primary samples. (D) Heatmaps of the relative concentration of 56 metabolites in the plasmas of 11 new cell line-derived xenografts (CLDX) and patient-derived xenografts (PDX) (normalized to the naïve condition, \log_2); n=3-10. (E) PCA of plasmas of mice xenografted with cell lines and primary samples with known OXPHOS status, representation of the second component, separating xenografted mice without treatment depending on their OXPHOS status. (F) Venn diagrams of representative metabolites of low (green) and high (red) OXPHOS status in the two cohorts. p-values calculated with Welsh statistical test.

Supplementary Figure 1 related to Fig. 1. (A) Amino acids absolute concentrations in every tissue. (B) Volcano plot of the fold change (\log_2) ratio of metabolites in tissues of female vs. male mice. n=3-4.

Supplementary Figure 2 related to Fig. 4. (A) Orotate relative quantities in lung and kidney tissues.

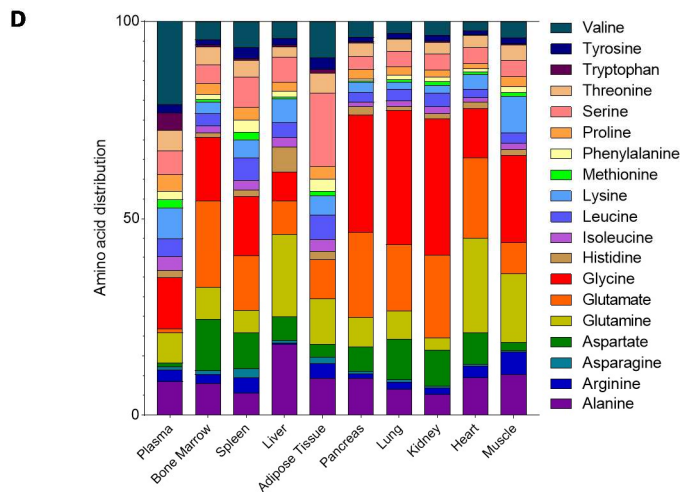
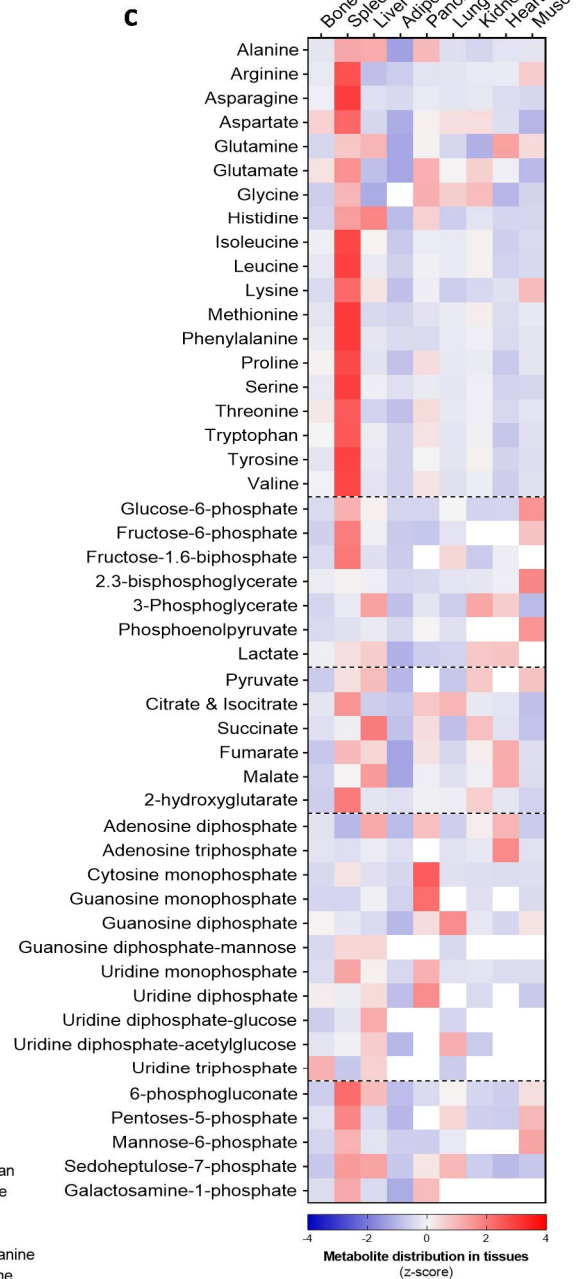
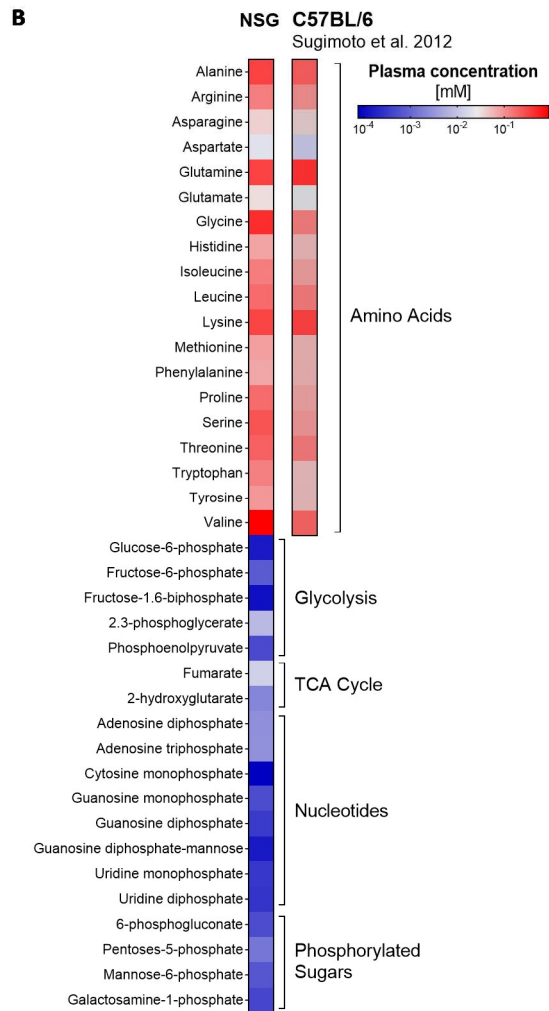
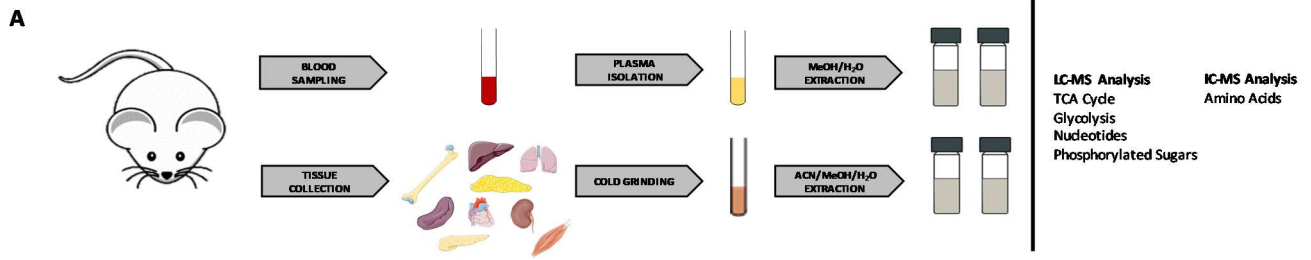


Figure 1.

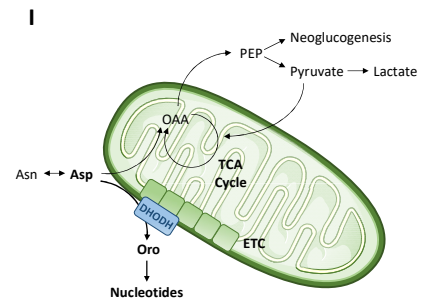
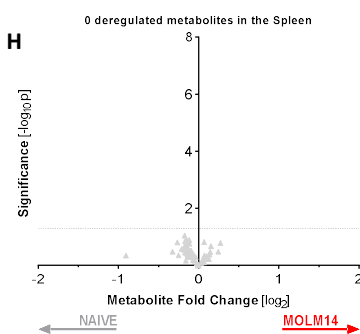
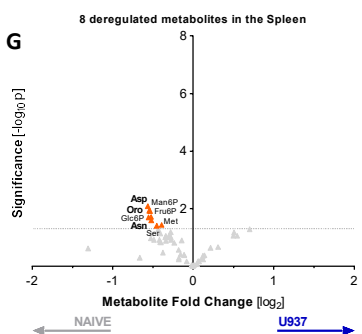
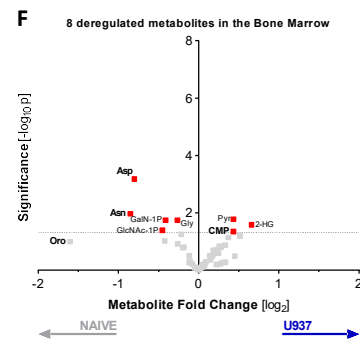
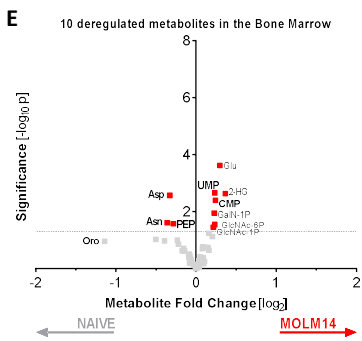
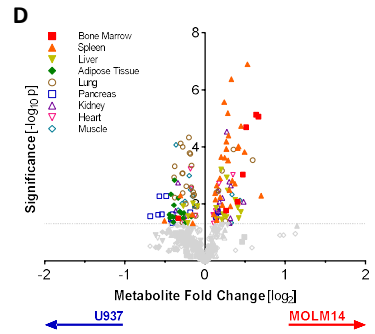
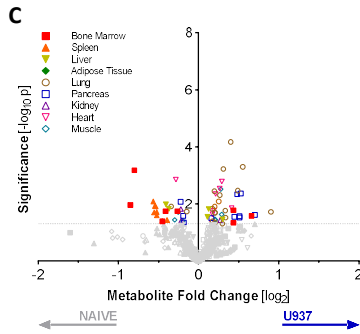
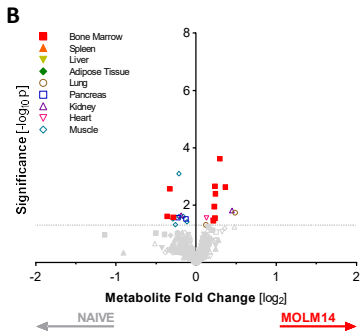
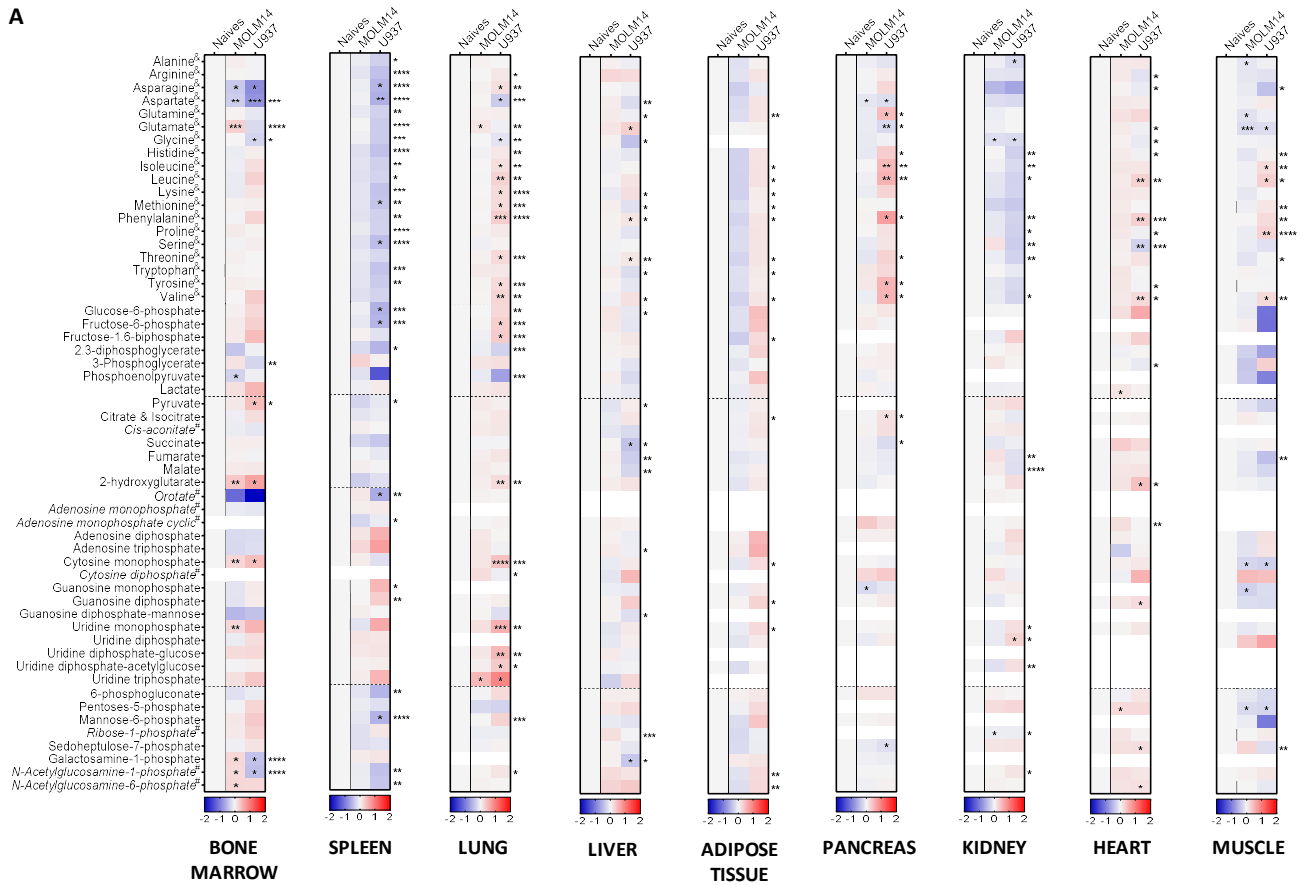


Figure 2.

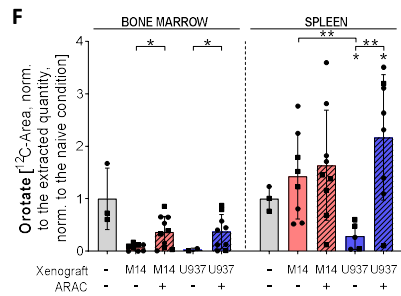
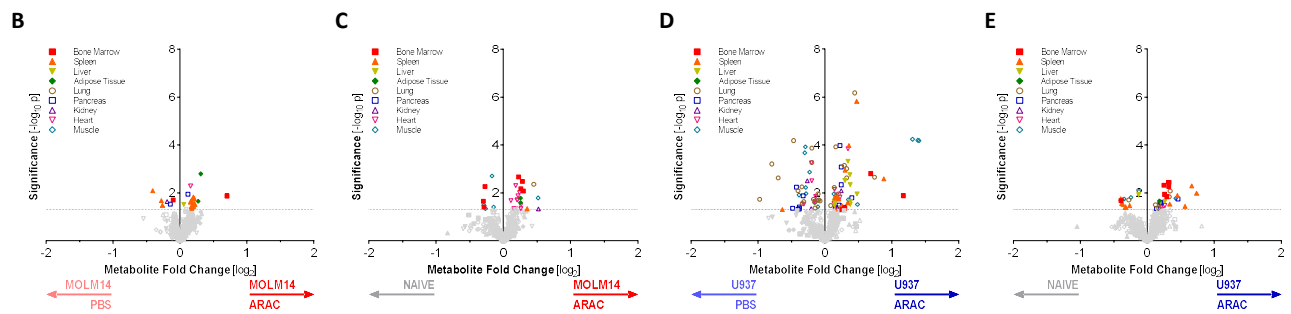
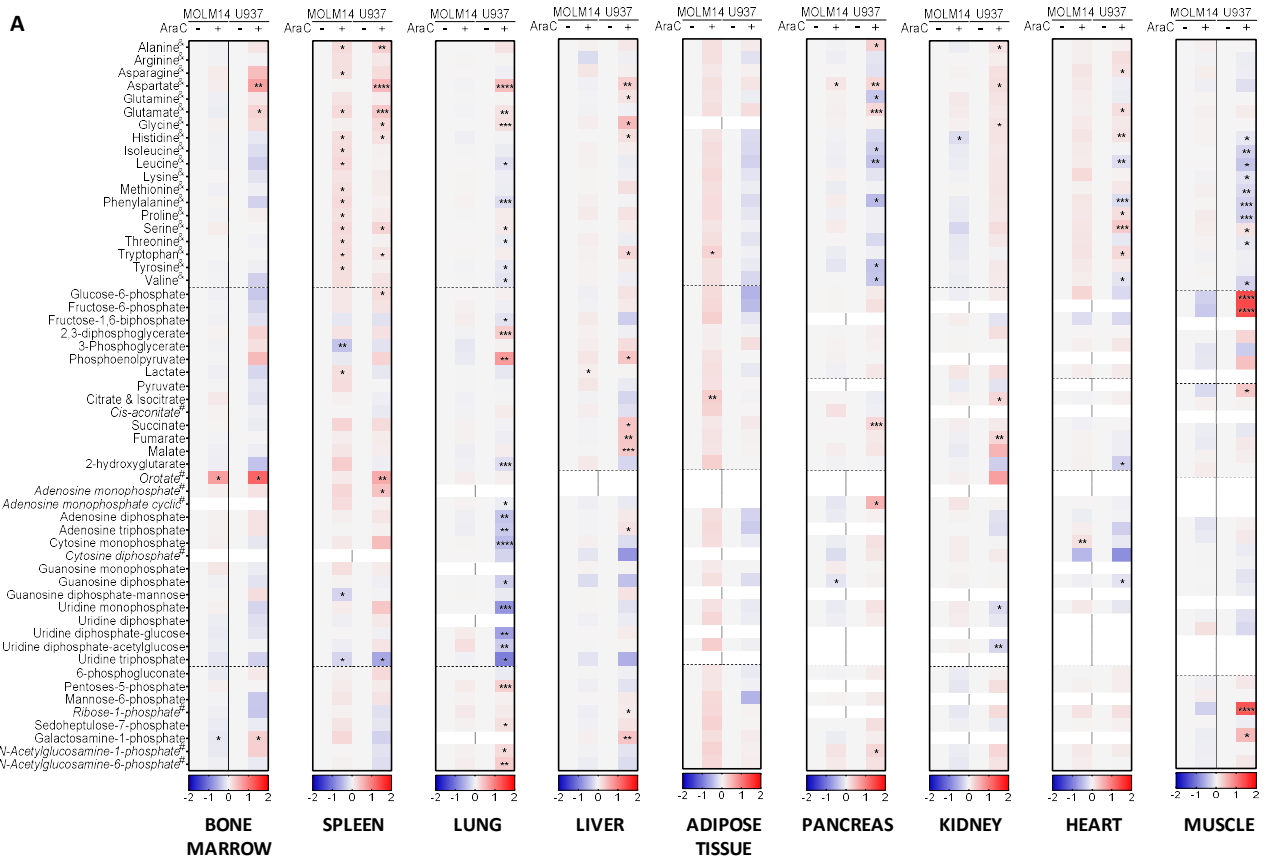


Figure 3.

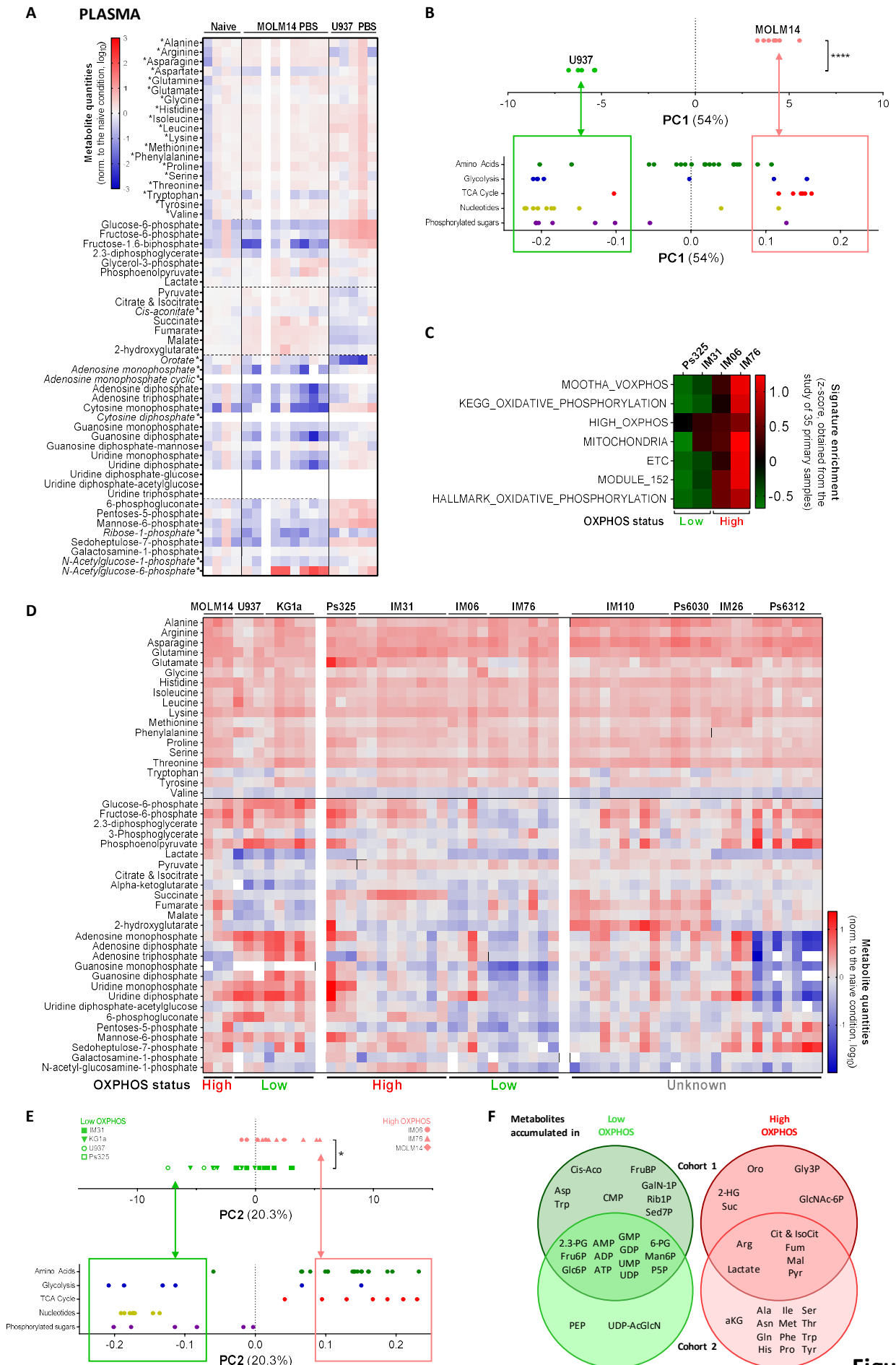


Figure 4.

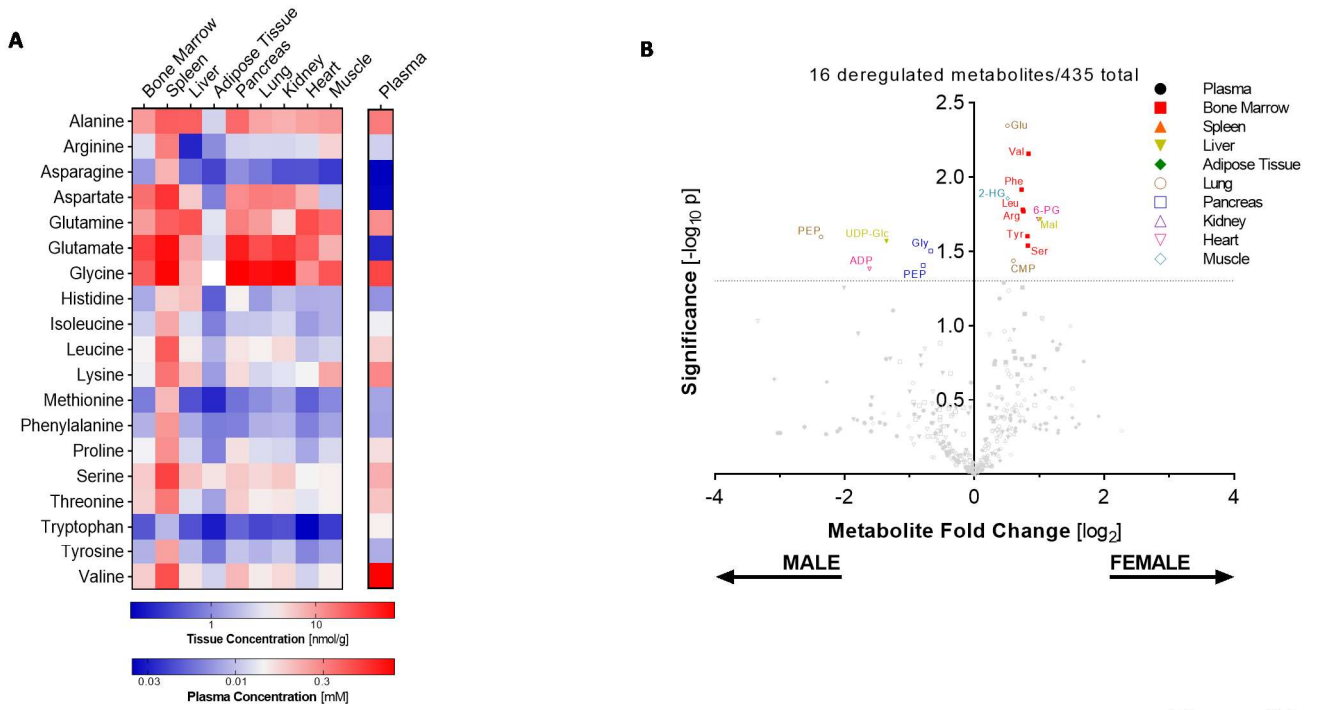


Figure S1.

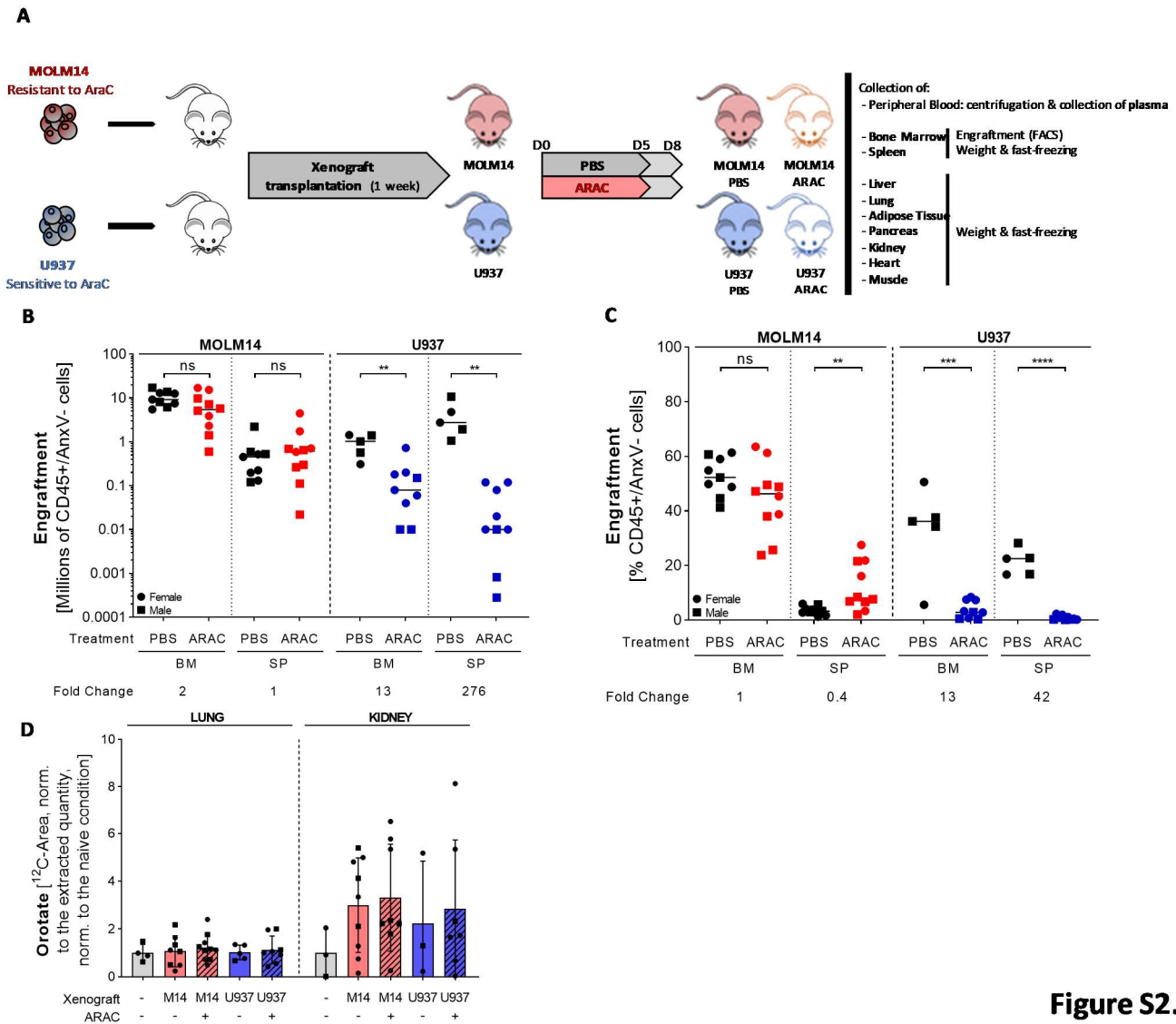


Figure S2.

Discussion générale

Discussion Générale

Durant mon projet doctoral, j'ai étudié un des facteurs principaux de la résistance et de la rechute des LAM : la capacité d'adaptation métabolique. Celle-ci peut s'intégrer à plusieurs échelles au sein de l'organisme : au niveau de la cellule unique, de la tumeur et de son hétérogénéité, des tissus, et enfin de l'organisme. J'ai articulé cette discussion autour de ces quatre échelles. A chacune de ces échelles, des mécanismes métaboliques permettent l'adaptation des cellules et la résistance aux traitements. L'étude et la compréhension des mécanismes mis en place à chacune de ces échelles permettront de proposer de nouvelles façons de traiter et d'améliorer la prise en charge des patients. Je finirai cette section par une discussion sur l'identification et l'utilisation de biomarqueurs métaboliques dans la prise en charge des patients cancéreux.

Métabolisme à l'échelle cellulaire

De nombreux mécanismes sont mis en place et permettent le soutien de la prolifération des cellules et la résistance aux thérapies. La flexibilité d'utilisation des nutriments (principalement les sucres, acides aminés et acides gras) permet à la cellule de répondre aux stress rencontrés. J'ai participé à des projets sur le rôle de l'adaptation et la flexibilité métabolique dans la résistance à l'AraC, au Venetoclax ainsi qu'aux inhibiteurs de FLT3^m et de IDH^m. Pour chacun de ces traitements, la maladie résiduelle est caractérisée par une modification majeure du métabolisme pour soutenir la prolifération, l'homéostasie énergétique et l'évasion à l'apoptose, avec pour actrice centrale la mitochondrie^{81,180,218,219}. De nombreuses voies métaboliques convergent au sein de la mitochondrie (cycle de Krebs et OxPHOS, cycle des folates, métabolisme des acides gras, ...), suggérant qu'un traitement mitochondrial peut impacter le métabolisme dans sa totalité. La mitochondrie représente alors une cible attractive pour le développement de traitements de consolidation voire de traitements en première intention. De nombreuses molécules ciblant différents aspects de l'activité mitochondriale sont en phase clinique ou en cours de développement. Les résultats de ces essais permettront de déterminer quelles combinaisons présentent un intérêt clinique.

Les spécificités métaboliques leucémiques, discutées dans l'introduction, révèlent également des dépendances et des cibles thérapeutiques potentielles dans de nombreuses voies métaboliques. Les possibilités de traitement évoluent donc très rapidement depuis 2017, année durant laquelle les premières nouvelles thérapies ont été approuvées. Cependant, le seul traitement curatif existant est l'allogreffe de moelle osseuse. L'efficacité des nouvelles thérapies proposées ou en développement reste limitée par la présence de cellules résistantes qui repeuplent la moelle osseuse du patient. Notre

DISCUSSION

compréhension des mécanismes de résistance reste donc insuffisante et de nouvelles approches sont nécessaires pour explorer le métabolisme à d'autres échelles.

Métabolisme intra-tumoral et son hétérogénéité

Alors que de nombreux mécanismes sont mis en place au sein des cellules leucémiques, celles-ci évoluent également dans un microenvironnement au contact les unes des autres. Elles interagissent ensemble et leur hétérogénéité est une forme de résistance qui commence à être connue. Des nouvelles technologies de transcriptomique et de séquençage ADN à l'échelle de la cellule unique ont été développées ces dernières années. Elles ont permis de comprendre qu'un autre aspect de la résistance résidait dans l'hétérogénéité clonale et la plasticité transcriptionnelle de la leucémie. L'émergence ou la prolifération de clones mutants et résistants aux traitements permettent la reprogession ou ré-initiation de la maladie^{34,78,80}. Ces analyses à l'échelle de la cellule unique ont également permis de comprendre que les leucémies ont une hétérogénéité métabolique à l'échelle transcriptionnelle importante^{15,370,371}. L'hétérogénéité du profil métabolique des tumeurs leucémiques n'a pas encore été évaluée fonctionnellement. Pourtant, on peut retrouver dans les cancers solides hypoxiques une hétérogénéité dans l'utilisation des nutriments dépendante du gradient de concentration en oxygène. Les cellules présentes dans les zones en hypoxie auront une activité glycolytique importante qui conduit à la production de lactate qui sera utilisé en périphérie par les cellules en normoxie qui ont un métabolisme mitochondrial augmenté³⁷². Il y a ainsi une collaboration entre deux populations de cellules tumorales distinctes de par leur métabolisme et leur position dans la tumeur, qui permet le maintien de la prolifération de la tumeur dans sa globalité. La moelle osseuse étant un organe possédant de nombreuses niches distinctes avec des populations cellulaires différentes^{371,373}, il peut être suggéré que les cellules leucémiques, en fonction de leur localisation dans la moelle osseuse, auront des phénotypes métaboliques et une utilisation des nutriments différents. Ne pourrions-nous donc pas imaginer caractériser les profils métabolomiques à l'échelle de la cellule unique de la tumeur ? Nous pourrions alors comprendre si et comment les différentes sous-populations leucémiques échangent informations et nutriments pour optimiser leur croissance et leur gestion des stress induits par les traitements. Même si les études transcriptomiques à l'échelle de la cellule unique permettent de commencer à répondre à ces questions, de nombreuses adaptations métaboliques ne se reflètent pas dans les niveaux d'expression des gènes. Il sera donc nécessaire de développer les méthodes de métabolomique à l'échelle de la cellule unique, afin de comprendre au mieux l'hétérogénéité métabolique d'une tumeur³⁷⁴. **La mise en place de nouvelles techniques, plus sensibles et plus robustes, sera donc nécessaire pour étudier et comprendre au mieux l'hétérogénéité métabolique d'une tumeur.**

Métabolismes tissulaires

Comme mentionné précédemment, le microenvironnement d'une cellule impacte son métabolisme. Les niches de la moelle osseuse, de par leur très grande diversité (en termes par exemple d'abondance de nutriments et d'oxygène, de populations cellulaires, ou de contraintes physiques microenvironnementales) sont un terrain propice à l'émergence de sous-populations métaboliques distinctes. On peut alors étudier le métabolisme à l'échelle tissulaire, en prenant en compte les interactions entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement. Des études sur les interactions mises en place entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement mènent à une compréhension plus globale de l'implication de l'hôte dans la prolifération et survie des cellules leucémiques. Au sein de la moelle osseuse, de nombreuses interactions permettent le transfert de nutriments du microenvironnement aux cellules leucémiques, et la réduction de la réponse immunitaire et de l'action des traitements. **Les blastes peuvent donc moduler les niches hématopoïétiques à leur profit**³⁷⁵. Pour comprendre ce type d'interactions, des méthodes comme l'imagerie par spectrométrie de masse sont intéressantes^{367,368}. Ces techniques, combinées à d'autres techniques comme l'immunohistochimie ou la cytométrie de flux couplée à de la spectrométrie de masse (CYTOF) adaptée à des coupes de tissus pour la caractérisation des types cellulaires, pourront générer des données spatiales du métabolisme des tissus et permettront une compréhension plus fine des interactions entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement.

Les blastes peuvent également avoir la capacité de migrer vers des organes distants, formant ce qu'on appelle communément la maladie extra-médullaire. Un quart des patients présentent des blastes extra-médullaires au moment du diagnostic. Même si cela est pris en compte dans la définition de la rémission, la maladie extra-médullaire ne figure pas dans les paramètres de définition des sous-groupes de patients, ni dans la classification des risques. Cela est en grande partie dû au fait que l'apparition de maladie extra-médullaire est peu référencée dans les bases de données des LAM. Cela se reflète également dans le domaine de recherche, où la plupart des études et modèles *in vivo* mis en place se focalisent sur la charge tumorale dans la moelle osseuse et la rate. Deux études de l'équipe de Craig Jordan ont cependant été publiées sur les mécanismes métaboliques mis en place par les blastes colonisant le foie ou les tissus adipeux. La principale notion qui ressort de ces articles est l'avantage de résistance des blastes dans ces organes. Les cellules du tissu hépatique et du tissu adipeux, en présence de blastes, relâchent en grandes quantités des lipides qui favorisent l'oxydation des acides gras chez les blastes et leur chimiorésistance. Chaque tissu ayant une structure, une fonction et un profil métabolique distinct, les mécanismes mis en place lors de la colonisation par les blastes peuvent être très différents. De plus, les traitements utilisés ciblent préférentiellement les organes hématopoïétiques, comme la moelle osseuse ou la rate³⁷⁶. Cela signifie que des cellules au

DISCUSSION

sein d'autres organes, comme la peau ou les gencives (deux sites de présence leucémique courants) ne seront pas exposées de la même façon. Bien que cela améliore le suivi des patients dont la maladie se concentre dans les organes hématopoïétiques, cela avantage également les cellules leucémiques nichées dans les organes distants. **Il est donc primordial de comprendre et proposer des traitements adaptés à cette maladie extra-médullaire.** Un autre axe de ciblage thérapeutique serait de comprendre comment les blastes développent leurs capacités de migration et de colonisation au sein de la moelle osseuse pour inhiber précocement la colonisation d'autres organes. Par exemple, cibler l'activité de CD36, un marqueur de surface impliqué dans la migration des blastes, pourrait potentiellement diminuer l'émergence de maladies extra-médullaires et améliorer la survie du sous-groupe de patient associé³⁷⁷.

Métabolisme systémique

Dans les études du métabolisme cancéreux, l'échelle systémique est rarement prise en compte. Quelques articles très informateurs ont été publiés^{355,378-380}, mais les technologies permettant l'étude du métabolisme systémique sont encore en développement. Dans les modèles sensibles et résistants de xénogreffe de cellules LAM que j'ai utilisés, j'ai observé une forte modulation du profil métabolique de chacun des tissus. Nous avons montré des changements majeurs des profils métaboliques de chaque tissu suite à une xénogreffe de la souris qui, de façon intéressante, dépend fortement de la lignée cellulaire injectée. Nous sommes actuellement en train de caractériser la présence de blastes dans les tissus analysés dans mes modèles. Cependant, nous savons déjà grâce à des études de bioluminescence que les profils de distribution des blastes sont dépendants de la lignée utilisée (**Figure 29**). Cela indique que **les caractéristiques intrinsèques d'une cellule leucémique peuvent définir en partie les sites de colonisation distants.**

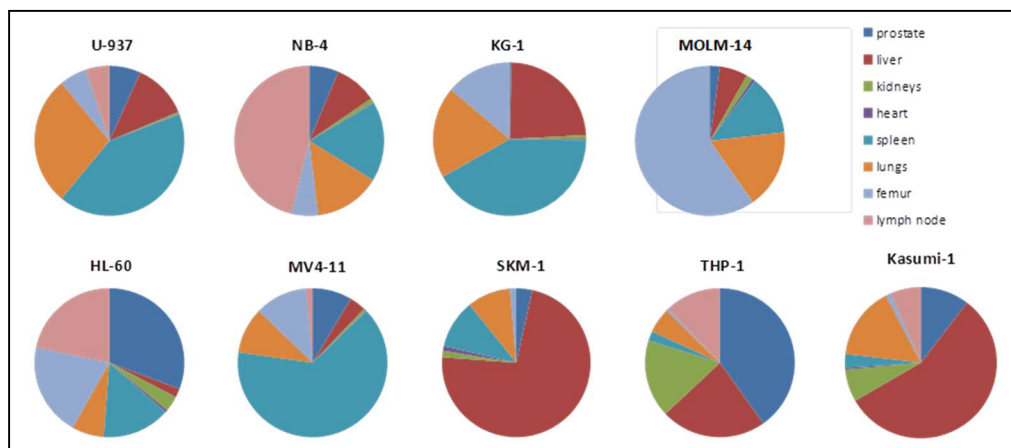


Figure 29. Répartition des blastes de 9 lignées LAM dans 8 tissus différents. Pourcentage de bioluminescence totale. (Collaboration Rémi Castellano & Yves Collette, CRCM)

La notion que les caractéristiques intrinsèques des blastes sont impliquées dans leur capacité à migrer et métastaser dans certains tissus est pour moi intéressante à explorer. En effet, la prise en charge des patients pourrait être améliorée si l'on pouvait identifier les sites de métastase du patient, à partir d'une analyse des blastes sanguins ou de la moelle osseuse. Dans le cancer du sein, les caractéristiques métaboliques des cellules corréntent avec les sites de métastase préférentiels, en fonction des reprogrammations métaboliques mises en place dans ces tissus. Les métastases dans le poumon ou l'os verront une activité mitochondriale augmentée, tandis que les métastases dans le foie sont caractérisées par une activité glycolytique accrue^{15,343}. Il n'a cependant pas encore été déterminé si l'activité métabolique définit le site de métastase du cancer du sein ou si le microenvironnement nouveau dans lequel se trouve la cellule métastatique définit les adaptations métaboliques qu'elle subit. Cette question est très intrigante, puisque dans le premier cas, on pourrait potentiellement prédire le site de métastase à partir d'une biopsie de la tumeur primaire. Dans le second cas, on pourrait adapter les traitements proposés en fonction du site de métastase. Une étude sur les LAL a mis en évidence par une expérience de « barcoding » *in vivo* que la distribution des clones leucémiques est différente selon chaque organe touché³⁸¹ (**Figure 30**). **Le site de métastase d'une tumeur n'est donc pas aléatoire et il est probable que l'on puisse identifier des cibles impliquées dans ce mécanisme.**

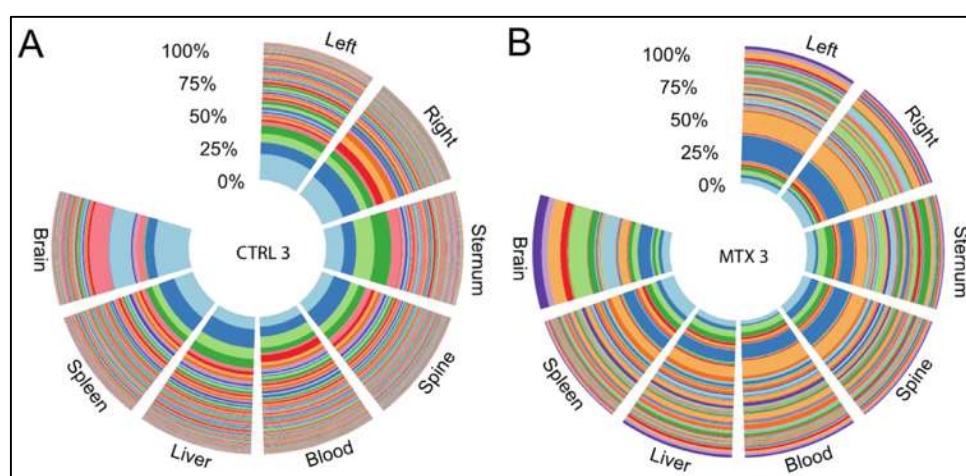


Figure 30. Caractérisation clonale de différents tissus de souris atteintes de LAL.

Les cellules leucémiques ont été taggées avec un barcode spécifique puis injecté dans des modèles murins. Ici, nous avons le suivi de ces barcodes dans différents tissus pré (A) et post (B) traitement au méthotrexate. On peut notamment observer que la répartition des clones résidants dans le cerveau est différente des autres organes. (Jacobs et al. 2020³⁸¹).

Il a été récemment montré que les cellules cancéreuses peuvent modifier le métabolisme systémique. La présence de cellules leucémiques dans le tissu adipeux ou les intestins entraîne respectivement une augmentation de la production du facteur IGFB1 par les adipocytes et une diminution de la production de sérotonine par le microbiote. Cela entraîne une diminution de la production d'insuline et le glucose

DISCUSSION

présent dans le sang est alors disponible pour la prolifération des cellules leucémiques³³⁸. L'utilisation systémique de la glutamine est également impactée¹⁷². Dans un organisme sain, la glutamine est produite par les muscles et les poumons, et consommée par le foie, les reins, le système immunitaire et les intestins. Dans un organisme atteint d'un cancer, la glutamine est principalement consommée par la tumeur, et les poumons et muscles augmentent leur production en conséquence. De façon intéressante, dans les modèles de xénotransplante de la lignée MOLM14, les blastes semblent impacter moins fortement les métabolomes des tissus murins que ceux du modèle U937. La charge tumorale des deux modèles étant similaire (de l'ordre de 10 millions de cellules au total dans la rate et moelle osseuse), mon hypothèse principale serait que les cellules MOLM14 ont un métabolisme très flexible et sont capables d'utiliser les nombreux nutriments disponibles dans leur microenvironnement sans reprogrammation majeure. Cela réduirait l'impact qu'elles ont sur l'organisme. Les cellules U937, quant à elles et afin de proliférer, ne sont pas très adaptables et reposent énormément sur la consommation de glucose. Elles modifieraient alors de façon importante le métabolisme systémique pour subvenir à leurs besoins. Les cellules saines supporteraient alors un stress important qui favorise d'autant plus la prolifération leucémique. **On pourrait alors considérer l'agressivité d'une tumeur en fonction de ces deux critères pour étudier sa prolifération et sa résistance aux traitements.**

Enfin, lorsque l'on s'intéresse au métabolisme systémique, plusieurs facteurs entrent alors en jeu : l'âge, le sexe et l'état de santé du patient, la nutrition, antécédents de maladies, rythme circadien et bien d'autres. L'impact de tous ces facteurs extrinsèques régulant le métabolisme systémique est complètement inconnu à ce jour. Comprendre comment ces facteurs peuvent influencer sur le devenir de la leucémie permettra certainement de développer de nouvelles stratégies. Le meilleur exemple de cela est l'utilisation de régimes particuliers pendant les traitements pour les rendre plus efficaces^{85,186,208}.

Identification de biomarqueurs métaboliques pertinents pour la prise en charge des patients

Le métabolisme systémique se reflète également dans le métabolome du plasma. Ce biofluide est à l'interface de tous les organes et permet la distribution des nutriments, la migration des cellules et l'élimination des déchets métaboliques. C'est donc un fluide extrêmement riche en informations sur l'état général de l'organisme. De nombreux biomarqueurs du plasma de natures très différentes sont utilisés dans le cadre général du soin. Les taux d'enzymes ALT et AST, deux transaminases principalement exprimées dans le foie, dans le sang reflètent des dommages au foie. La glycémie peut être évaluée pour le diagnostic d'un diabète. Les quantités d'urée dans le sang reflètent l'activité rénale du patient. Il est donc évident que **le sang et le plasma sont sources de nombreuses**

informations et, à l'exception de métabolites clés comme le 2-HG, la plupart des biomarqueurs recherchés dans ces fluides sont de nature génique ou protéique. Pourtant, les taux de métabolites dans le sang restent peu étudiés.

Je me suis intéressé à ce concept durant ma thèse, en corrélant les signatures plasmatiques aux caractéristiques métaboliques intrinsèques des cellules injectées. De façon très intéressante, j'ai pu discriminer sur mes cohortes les xénogreffes de cellules en fonction de leur activité mitochondriale avant injection. Je discutais précédemment de l'intérêt de définir des biomarqueurs de l'activité métabolique d'une tumeur pour en prédire des phénotypes comme les sites de métastase ou la chimiorésistance. Ici, cette signature a pour moi un réel potentiel de prédiction de la réponse à l'AraC. En effet, des données non soumises à publication car trop préliminaires nous permettent de discriminer les modèles résistants et sensibles à l'AraC, selon une signature plasmatique très similaire (**Figure 31 et Figure 32**). De fortes concentrations plasmatiques en métabolites du cycle de Krebs et en nucléotides caractérisent des modèles résistants, tandis que des concentrations élevées en métabolites de la glycolyse et acides aminés caractérisent des modèles sensibles. Cette signature est très similaire à celle discriminant le statut OxPHOS des cellules injectées. De façon intéressante, la valeur du composant 5 de ce modèle statistique corrèle négativement avec la réduction tumorale post-AraC (**Figure 32**). Ces données sont préliminaires et insuffisantes pour conclure, puisque la prise en greffe des modèles est variable, et des données de sensibilité à l'AraC sont manquantes. De même, il sera nécessaire de vérifier si cette signature peut être appliquée à des échantillons humains. Cependant, ces données renforcent l'article de 2014 discuté précédemment³³⁵ dans lequel les auteurs ont pu identifier une signature de 6 métabolites dans le plasma comme un facteur pronostic indépendant. Cette signature est composée des métabolites suivants : glycérol-3-phosphate, pyruvate, lactate, citrate, aKG et 2-HG. Bien que les données sur l'aKG soient manquantes dans nos métabolomes, des taux élevés des autres métabolites sont caractéristiques d'un modèle résistant. **Il serait ainsi intéressant de continuer cette étude afin de définir clairement un jeu de métabolites prédictifs de la résistance à l'AraC qui pourra être implémenté en clinique.** Un article de mon équipe récemment accepté (Bosc et al., Nature Cancer 2021) propose également des biomarqueurs de l'activité mitochondriale (Mitoscore) des cellules leucémiques. Il serait alors possible de combiner la caractérisation métabolomique plasmatique à ces biomarqueurs intracellulaires sur un même échantillon de sang pour obtenir un biomarqueur puissant de la résistance à l'AraC.

DISCUSSION

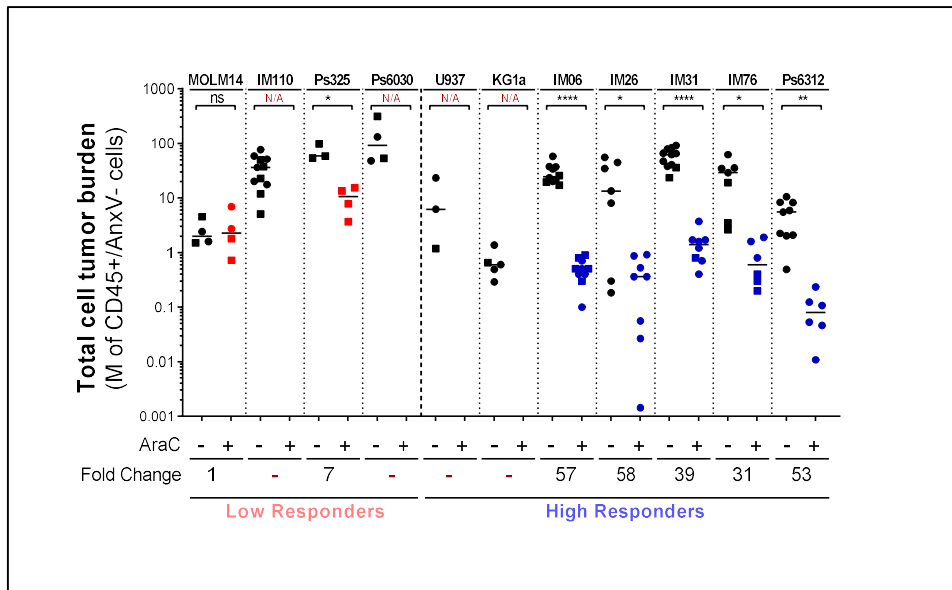


Figure 31. Prise en greffe des modèles compris dans l'analyse métabolomique des plasmas. Les modèles IM110, Ps6030, U937 et KG1a n'ont pas été traités à l'AraC dans ces expériences.

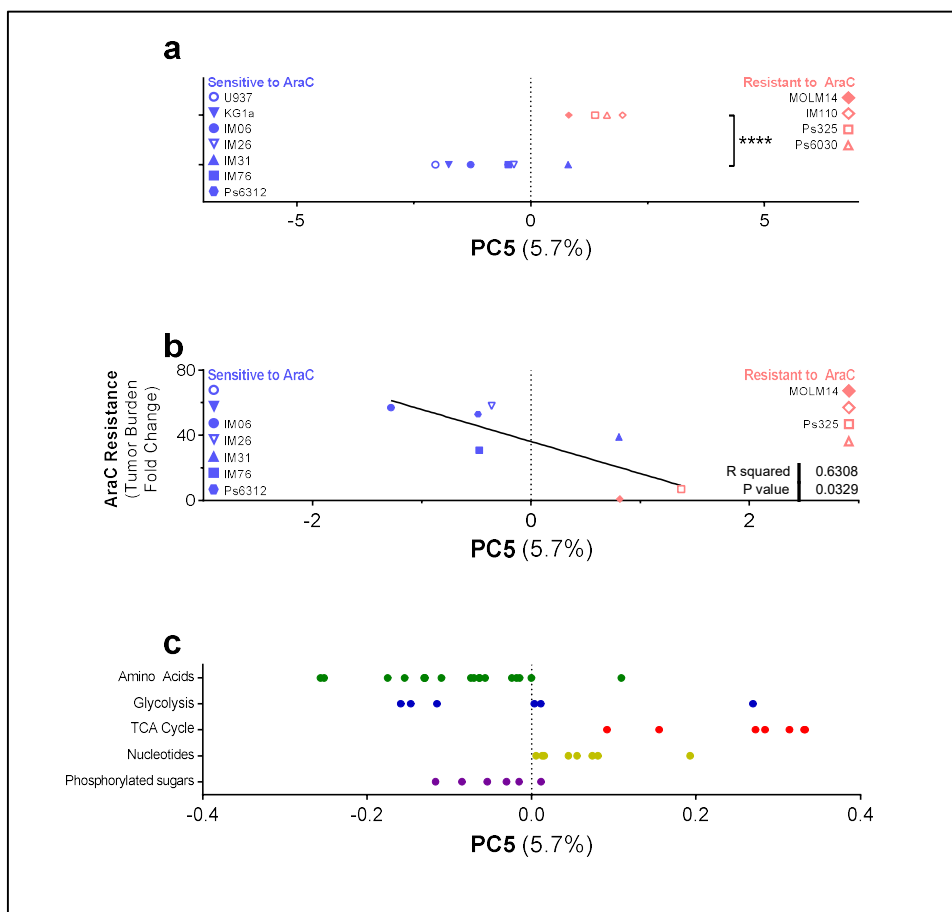


Figure 32. Signature de la chimiorésistance.

a. Le composant principal PC5, décrivant 5% des variations totales de la cohorte, discrimine significativement les modèles résistants (en rouge) des modèles sensibles (en bleu). b. Corrélation entre réduction tumorale post-AraC et PC5. Les modèles pour lesquels la réduction tumorale post-AraC n'était pas disponible ont été exclus. c. Contribution des métabolites dans le PC5.

Comme dit précédemment, de nombreux traitements ont été approuvés ces dernières années et de nombreux sont encore en phase de développement. La plupart ont des résultats très prometteurs sur certains sous-groupes de patients. Une des problématiques qui émerge actuellement est le choix de la thérapie utilisée face à un diagnostic de LAM. Il est de plus en plus nécessaire d'évaluer avant traitement quelles caractéristiques les cellules LAM possèdent afin d'adapter le schéma thérapeutique du patient et optimiser les taux de réponses. Pour cela, des classifications des LAM ont été proposées, dont la classification FAB et le score pronostic ELN2017. De nombreux facteurs sont pris en compte dans ces classifications, comme l'âge et l'état général du patient, les comorbidités, l'origine de la LAM ou les mutations génétiques. Cependant, à mon sens, même si ces classifications permettent de bien cadrer le schéma thérapeutique d'origine du patient, elles ne répondent pas entièrement aux adaptations métaboliques impliqués dans la résistance. Bien que de nouvelles techniques analytiques comme le NGS ont été développées pour appréhender l'hétérogénéité mutationnelle des résistances, les capacités d'adaptation métabolique des blastes ne peuvent pas être questionnées par ces techniques. Des biomarqueurs précoces de la maladie et de résistance devraient être identifiés afin de répondre le plus rapidement et le plus efficacement avec un traitement personnalisé et optimisé. Pour cela, la réponse métabolique systémique retrouvée dans le plasma est une piste majeure et très intéressante.

DISCUSSION

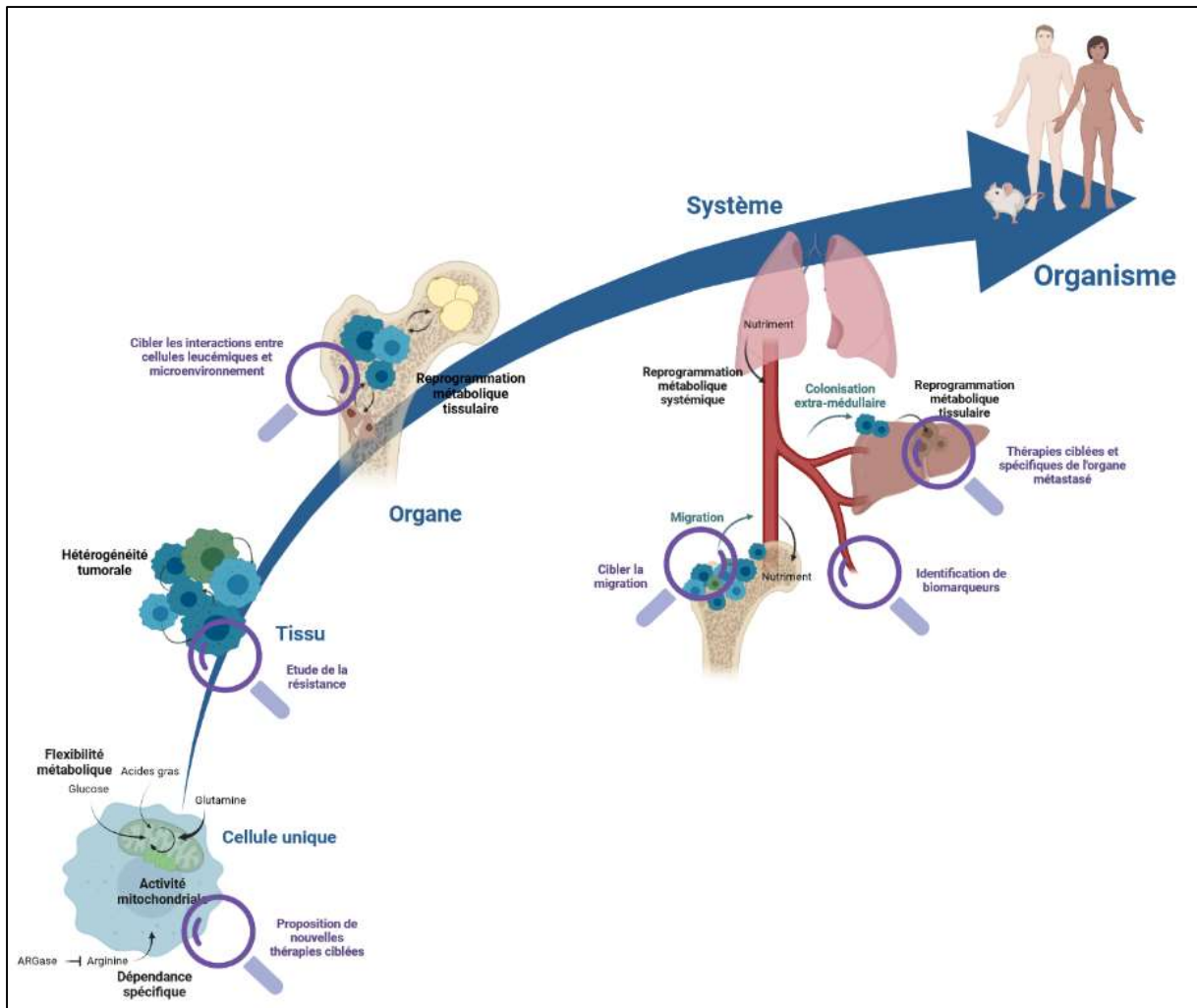


Figure 33. Schéma résumé

EN BREF

Il existe encore de nombreuses problématiques impliquant le métabolisme dans le cancer. On découvre de plus en plus que les métabolismes tissulaires et systémiques sont cruciaux dans la compréhension des cancers et la réponse aux thérapies. Il est urgent de développer des méthodes d'étude du métabolisme à l'échelle du tissu ou de l'organisme, en particulier pour des projets cliniques. Mon projet de thèse a été une étape vers le développement de ces méthodes et même si mon travail présente plusieurs limitations, j'espère cependant qu'il convaincra de l'importance de l'étude du métabolisme tissulaire et systémiques, ainsi que de l'intérêt de l'identification de biomarqueurs précoces. A mes yeux, l'étude de ces deux points permettra de proposer de nouvelles thérapies ciblées et de proposer le traitement le plus adapté aux besoins du patient.

Aussi, de nombreux articles démontrent déjà l'importance du métabolisme tissulaire ou systémique dans de nombreux autres cancers et maladies métaboliques. L'étude du métabolisme cellulaire, bien qu'elle apporte de nombreuses pistes de traitements, est aujourd'hui insuffisante. Intégrer une vision du métabolisme à chacune des échelles permettra très certainement de comprendre au mieux les adaptations métaboliques qui apparaissent dans les cancers et de proposer les traitements les plus efficaces.

Bibliographie

Bibliographie

1. Chang, H. Y. *et al.* Causes of death in adults with acute leukemia. *Medicine (Baltimore)* **55**, 259–268 (1976).
2. Sung, L., Lange, B. J., Gerbing, R. B., Alonzo, T. A. & Feusner, J. Microbiologically documented infections and infection-related mortality in children with acute myeloid leukemia. *Blood* **110**, 3532–3539 (2007).
3. Gatta, G. *et al.* Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet-a population-based study. *Lancet Oncol* **18**, 1022–1039 (2017).
4. Haeckel, E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte* (1868).
5. Pappenheim, A. Zwei Fälle akuter grosslymphozytärer Leukämie. *Fol Haematol* **4**, 301–308 (1907).
6. Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Marks, E. K. & Eldredge, J. H. Recovery from radiation injury. *Science* **113**, 510–511 (1951).
7. Till, J. E. & McCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213–222 (1961).
8. Spangrude, G. J., Heimfeld, S. & Weissman, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58–62 (1988).
9. Doulatov, S. *et al.* Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* **11**, 585–593 (2010).
10. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295–306 (2005).
11. Goardon, N. *et al.* Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **19**, 138–152 (2011).
12. Park, S.-J. *et al.* Computational promoter modeling identifies the modes of transcriptional regulation in hematopoietic stem cells. *PLoS One* **9**, e93853 (2014).
13. Wilson, A. *et al.* Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**, 1118–1129 (2008).
14. Müller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Thoman, M., Adkins, B. & Sieburg, H. B. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* **100**, 1302–1309 (2002).
15. LeBleu, V. S. *et al.* PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology* **16**, 992–1003 (2014).
16. Baldrige, M. T., King, K. Y., Boles, N. C., Weksberg, D. C. & Goodell, M. A. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature* **465**, 793–797 (2010).

BIBLIOGRAPHIE

17. Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X. & Weissman, I. L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3120–3125 (1999).
18. Cabezas-Wallscheid, N. *et al.* Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell* **169**, 807–823.e19 (2017).
19. Simsek, T. *et al.* The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **7**, 380–390 (2010).
20. Takubo, K. *et al.* Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 49–61 (2013).
21. Warr, M. R. *et al.* FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* **494**, 323–327 (2013).
22. Ho, T. T. *et al.* Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* **543**, 205–210 (2017).
23. Guo, B., Huang, X., Lee, M. R., Lee, S. A. & Broxmeyer, H. E. Antagonism of PPAR- γ signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. *Nat Med* **24**, 360–367 (2018).
24. Ito, K. *et al.* A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* **18**, 1350–1358 (2012).
25. Vannini, N. *et al.* Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity. *Nat Commun* **7**, 13125 (2016).
26. Ito, K. *et al.* Self-renewal of a purified Tie2⁺ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science* **354**, 1156–1160 (2016).
27. Signer, R. A. J., Magee, J. A., Salic, A. & Morrison, S. J. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* **509**, 49–54 (2014).
28. Yu, W.-M. *et al.* Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* **12**, 62–74 (2013).
29. Velten, L. *et al.* Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol* **19**, 271–281 (2017).
30. Laurenti, E. & Göttgens, B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* **553**, 418–426 (2018).
31. Patel, J. P. *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **366**, 1079–1089 (2012).
32. Lagunas-Rangel, F. A., Chávez-Valencia, V., Gómez-Guijosa, M. Á. & Cortes-Penagos, C. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* **11**, 328–339 (2017).
33. Kelly, L. M. & Gilliland, D. G. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**, 179–198 (2002).

34. Danlos, F.-X., Papo, M. & Micol, J.-B. L'hématopoïèse clonale : un concept émergent à la croisée des spécialités. *La Revue de Médecine Interne* **40**, 684–692 (2019).
35. Abelson, S. *et al.* Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature* **559**, 400–404 (2018).
36. Murphy, T. *et al.* Impact of preleukemic mutations and their persistence on hematologic recovery after induction chemotherapy for AML. *Blood Adv* **3**, 2307–2311 (2019).
37. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730–737 (1997).
38. Sarry, J.-E. *et al.* Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice. *J Clin Invest* **121**, 384–395 (2011).
39. Kirstetter, P. *et al.* Modeling of C/EBP α mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cancer Cell* **13**, 299–310 (2008).
40. Cozzio, A. *et al.* Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* **17**, 3029–3035 (2003).
41. Huntly, B. J. P. *et al.* MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* **6**, 587–596 (2004).
42. Krivtsov, A. V. *et al.* Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* **442**, 818–822 (2006).
43. Ye, M. *et al.* Hematopoietic Differentiation Is Required for Initiation of Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell* **17**, 611–623 (2015).
44. McKenzie, M. D. *et al.* Interconversion between Tumorigenic and Differentiated States in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell* **25**, 258-272.e9 (2019).
45. Arnone, M. *et al.* Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: The Challenges of Phenotypic Heterogeneity. *Cancers* **12**, 3742 (2020).
46. Liu, Y. *et al.* CD9, a potential leukemia stem cell marker, regulates drug resistance and leukemia development in acute myeloid leukemia. *Stem Cell Res Ther* **12**, 86 (2021).
47. Larrue, C. *et al.* Adrenomedullin-CALCRL axis controls relapse-initiating drug tolerant acute myeloid leukemia cells. *Nat Commun* **12**, 422 (2021).
48. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**, 451–458 (1976).
49. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
50. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).

BIBLIOGRAPHIE

51. Herold, T. *et al.* Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **34**, 3161–3172 (2020).
52. de Greef, G. E. *et al.* Criteria for defining a complete remission in acute myeloid leukaemia revisited. An analysis of patients treated in HOVON-SAKK co-operative group studies. *Br J Haematol* **128**, 184–191 (2005).
53. Dombret, H. & Gardin, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* **127**, 53–61 (2016).
54. Fenwarth, L. *et al.* A personalized approach to guide allogeneic stem cell transplantation in younger adults with acute myeloid leukemia. *Blood* **137**, 524–532 (2021).
55. Wei, A. H. *et al.* Venetoclax plus LDAC for newly diagnosed AML ineligible for intensive chemotherapy: a phase 3 randomized placebo-controlled trial. *Blood* **135**, 2137–2145 (2020).
56. DiNardo, C. D. *et al.* Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **383**, 617–629 (2020).
57. Pollyea, D. A. *et al.* Venetoclax with azacitidine or decitabine in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Long term follow-up from a phase 1b study. *Am J Hematol* **96**, 208–217 (2021).
58. Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts. *SEER*
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
59. Cheson, B. D. *et al.* Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* **21**, 4642–4649 (2003).
60. Stahl, M. & Tallman, M. S. Acute promyelocytic leukemia (APL): remaining challenges towards a cure for all. *Leukemia & Lymphoma* **60**, 3107–3115 (2019).
61. Lai, C., Doucette, K. & Norsworthy, K. Recent drug approvals for acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* **12**, (2019).
62. Cucchi, D. G. J. *et al.* Two decades of targeted therapies in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **35**, 651–660 (2021).
63. Spreafico, A., Hansen, A. R., Abdul Razak, A. R., Bedard, P. L. & Siu, L. L. The Future of Clinical Trial Design in Oncology. *Cancer Discov* **11**, 822–837 (2021).
64. Kennedy, V. E. & Smith, C. C. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front Oncol* **10**, 612880 (2020).
65. Cancer Genome Atlas Research Network *et al.* Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **368**, 2059–2074 (2013).
66. Papaemmanuil, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **374**, 2209–2221 (2016).

67. Stone, R. M., Manley, P. W., Larson, R. A. & Capdeville, R. Midostaurin: its odyssey from discovery to approval for treating acute myeloid leukemia and advanced systemic mastocytosis. *Blood Advances* **2**, 444–453 (2018).
68. Gorcea, C. M., Burthem, J. & Tholouli, E. ASP2215 in the treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia with FLT3 mutation: background and design of the ADMIRAL trial. *Future Oncol* **14**, 1995–2004 (2018).
69. Perl, A. E. *et al.* Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med* **381**, 1728–1740 (2019).
70. Scholl, S., Fleischmann, M., Schnetzke, U. & Heidel, F. H. Molecular Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Ongoing Challenges and Future Treatments. *Cells* **9**, E2493 (2020).
71. Cerchione, C. *et al.* IDH1/IDH2 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol* **11**, (2021).
72. Ward, P. S. *et al.* The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* **17**, 225–234 (2010).
73. Xu, W. *et al.* Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* **19**, 17–30 (2011).
74. Boutzen, H. *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 mutations prime the all-trans retinoic acid myeloid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* **213**, 483–497 (2016).
75. Paschka, P. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol* **28**, 3636–3643 (2010).
76. Stein, E. M. *et al.* Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **130**, 722–731 (2017).
77. DiNardo, C. D. *et al.* Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med* **378**, 2386–2398 (2018).
78. Intlekofer, A. M. *et al.* Acquired resistance to IDH inhibition through trans or cis dimer-interface mutations. *Nature* **559**, 125–129 (2018).
79. Harding, J. J. *et al.* Isoform Switching as a Mechanism of Acquired Resistance to Mutant Isocitrate Dehydrogenase Inhibition. *Cancer Discov* **8**, 1540–1547 (2018).
80. Choe, S. *et al.* Molecular mechanisms mediating relapse following ivosidenib monotherapy in IDH1-mutant relapsed or refractory AML. *Blood Adv* **4**, 1894–1905 (2020).
81. Stuani, L. *et al.* Mitochondrial metabolism supports resistance to IDH mutant inhibitors in acute myeloid leukemia. *Journal of Experimental Medicine* **218**, (2021).
82. Samra, B., Konopleva, M., Isidori, A., Daver, N. & DiNardo, C. Venetoclax-Based Combinations in Acute Myeloid Leukemia: Current Evidence and Future Directions. *Front Oncol* **10**, 562558 (2020).

BIBLIOGRAPHIE

83. Roberts, A. W. Therapeutic development and current uses of BCL-2 inhibition. *Hematology* **2020**, 1–9 (2020).
84. Jones, C. L. *et al.* Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell* **34**, 724–740.e4 (2018).
85. Jones, C. L. *et al.* Cysteine depletion targets leukemia stem cells through inhibition of electron transport complex II. *Blood* **134**, 389–394 (2019).
86. Stevens, B. M. *et al.* Fatty acid metabolism underlies venetoclax resistance in acute myeloid leukemia stem cells. *Nat Cancer* **1**, 1176–1187 (2020).
87. Lainez-González, D., Serrano-López, J. & Alonso-Domínguez, J. M. Understanding the Hedgehog Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: A Necessary Step toward a Cure. *Biology (Basel)* **10**, (2021).
88. Queiroz, K. C. S. *et al.* Hedgehog signaling maintains chemoresistance in myeloid leukemic cells. *Oncogene* **29**, 6314–6322 (2010).
89. Cortes, J. E. *et al.* Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **33**, 379–389 (2019).
90. Cortes, J. E. *et al.* Glasdegib plus intensive/nonintensive chemotherapy in untreated acute myeloid leukemia: BRIGHT AML 1019 Phase III trials. *Future Oncol* **15**, 3531–3545 (2019).
91. Ehninger, A. *et al.* Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* **4**, e218 (2014).
92. Hamann, P. R. *et al.* An Anti-CD33 Antibody–Calicheamicin Conjugate for Treatment of Acute Myeloid Leukemia. Choice of Linker. *Bioconjugate Chem.* **13**, 40–46 (2002).
93. Gamis, A. S. *et al.* Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: results from the randomized phase III Children’s Oncology Group trial AAML0531. *J Clin Oncol* **32**, 3021–3032 (2014).
94. Amadori, S. *et al.* Gemtuzumab Ozogamicin Versus Best Supportive Care in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Unsuitable for Intensive Chemotherapy: Results of the Randomized Phase III EORTC-GIMEMA AML-19 Trial. *J Clin Oncol* **34**, 972–979 (2016).
95. Raut, L. S. Novel formulation of cytarabine and daunorubicin: A new hope in AML treatment. *South Asian J Cancer* **4**, 38–40 (2015).
96. Tardi, P. *et al.* In vivo maintenance of synergistic cytarabine:daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. *Leuk Res* **33**, 129–139 (2009).
97. Lancet, J. E. *et al.* CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* **36**, 2684–2692 (2018).
98. Tiong, I. S. & Wei, A. H. New drugs creating new challenges in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **58**, 903–914 (2019).

99. Vosberg, S. & Greif, P. A. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes Chromosomes Cancer* **58**, 839–849 (2019).
100. Zhang, J., Gu, Y. & Chen, B. Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther* **12**, 1937–1945 (2019).
101. McNeer, N. A. *et al.* Genetic mechanisms of primary chemotherapy resistance in pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia* **33**, 1934–1943 (2019).
102. McMahon, C. M. *et al.* Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov* **9**, 1050–1063 (2019).
103. Morita, K. *et al.* Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat Commun* **11**, 5327 (2020).
104. Herling, C. D. *et al.* Clonal dynamics towards the development of venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun* **9**, 727 (2018).
105. Thomas, D. & Majeti, R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* **129**, 1577–1585 (2017).
106. Ng, S. W. K. *et al.* A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* **540**, 433–437 (2016).
107. Boyd, A. L. *et al.* Identification of Chemotherapy-Induced Leukemic-Regenerating Cells Reveals a Transient Vulnerability of Human AML Recurrence. *Cancer Cell* **34**, 483–498.e5 (2018).
108. Williams, M. S. & Somervaille, T. C. P. Dynamic induction of drug resistance through a stress-responsive enhancer in acute myeloid leukemia. *Mol Cell Oncol* **7**, 1705730 (2020).
109. Nooter, K. & Sonneveld, P. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in haematological malignancies. *Leuk Res* **18**, 233–243 (1994).
110. Williams, M. S., Amaral, F. M., Simeoni, F. & Somervaille, T. C. A stress-responsive enhancer induces dynamic drug resistance in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* **130**, 1217–1232 (2020).
111. Liu, X. *et al.* miR-181a promotes G1/S transition and cell proliferation in pediatric acute myeloid leukemia by targeting ATM. *J Cancer Res Clin Oncol* **142**, 77–87 (2016).
112. Lin, Y. *et al.* miR-638 regulates differentiation and proliferation in leukemic cells by targeting cyclin-dependent kinase 2. *J Biol Chem* **290**, 1818–1828 (2015).
113. Salvatori, B. *et al.* The microRNA-26a target E2F7 sustains cell proliferation and inhibits monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cell Death Dis* **3**, e413 (2012).
114. Tian, P. & Yan, L. Inhibition of MicroRNA-149-5p Induces Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cell Line THP-1 by Targeting Fas Ligand (FASLG). *Med Sci Monit* **22**, 5116–5123 (2016).
115. Feron, O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* **92**, 329–333 (2009).

BIBLIOGRAPHIE

116. Sonveaux, P. *et al.* Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* **118**, 3930–3942 (2008).
117. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* **8**, 519–530 (1927).
118. Funes, J. M. *et al.* Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *PNAS* **104**, 6223–6228 (2007).
119. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* **23**, 27–47 (2016).
120. Park, J. K., Coffey, N. J., Limoges, A. & Le, A. The Heterogeneity of Lipid Metabolism in Cancer. *Adv Exp Med Biol* **1063**, 33–55 (2018).
121. Lukey, M. J., Katt, W. P. & Cerione, R. A. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov Today* **22**, 796–804 (2017).
122. Lane, A. N. & Fan, T. W.-M. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res* **43**, 2466–2485 (2015).
123. Katada, S., Imhof, A. & Sassone-Corsi, P. Connecting Threads: Epigenetics and Metabolism. *Cell* **148**, 24–28 (2012).
124. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’ Heel. *Cancer Cell* **13**, 472–482 (2008).
125. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
126. Pérez-Tomás, R. & Pérez-Guillén, I. Lactate in the Tumor Microenvironment: An Essential Molecule in Cancer Progression and Treatment. *Cancers (Basel)* **12**, E3244 (2020).
127. Platten, M., Nollen, E. A. A., Röhrig, U. F., Fallarino, F. & Opitz, C. A. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 379–401 (2019).
128. Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**, 99–163 (2007).
129. Lewis, N. E. & Abdel-Haleem, A. M. The evolution of genome-scale models of cancer metabolism. *Front Physiol* **4**, 237 (2013).
130. Park, J. H., Pyun, W. Y. & Park, H. W. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells* **9**, (2020).
131. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2017).
132. Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J.-M. & Kohn, E. C. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* **120**, 3446–3456 (2014).

133. Hoxhaj, G. & Manning, B. D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **20**, 74–88 (2020).
134. Guan, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* **5**, 402–418 (2015).
135. Liu, J., Zhang, C., Hu, W. & Feng, Z. Tumor suppressor p53 and metabolism. *J Mol Cell Biol* **11**, 284–292 (2019).
136. Zhang, J. *et al.* ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 4350965 (2016).
137. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. Each Organ Has a Unique Metabolic Profile. *Biochemistry. 5th edition* (2002).
138. Brosnan, J. T. Interorgan Amino Acid Transport and its Regulation. *The Journal of Nutrition* **133**, 2068S-2072S (2003).
139. Vlaski-Lafarge, M. *et al.* Normal Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Can Exhibit Metabolic Flexibility Similar to Cancer Cells. *Front Oncol* **10**, 713 (2020).
140. Kreitz, J. *et al.* Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia. *Cells* **8**, E805 (2019).
141. Culp-Hill, R. Extinguishing the Embers: Targeting AML Metabolism. *Trends in Molecular Medicine* **13**.
142. Stuani, L., Sabatier, M. & Sarry, J.-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biol* **17**, (2019).
143. Tabe, Y., Lorenzi, P. L. & Konopleva, M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. *Blood* **134**, 1014–1023 (2019).
144. Lunt, S. Y. & Vander Heiden, M. G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 441–464 (2011).
145. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
146. Berg, J. M. *et al.* *Biochemistry.* (W H Freeman, 2002).
147. Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* **292**, 504–507 (2001).
148. Halestrap, A. P. The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* **148**, 85–96 (1975).
149. Paradies, G., Capuano, F., Palombini, G., Galeotti, T. & Papa, S. Transport of pyruvate in mitochondria from different tumor cells. *Cancer Res* **43**, 5068–5071 (1983).
150. Zu, X. L. & Guppy, M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 459–465 (2004).
151. Hosios, A. M. *et al.* Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell* **36**, 540–549 (2016).

BIBLIOGRAPHIE

152. New Clarity on the Warburg Effect - National Cancer Institute.
<https://www.cancer.gov/research/key-initiatives/ras/ras-central/blog/2021/vander-heiden-warburg-effect> (2021).
153. Cunningham, I. & Kohno, B. 18FDG-PET/CT: 21st century approach to leukemic tumors in 124 cases. *American Journal of Hematology* **91**, 379–384 (2016).
154. Song, K. *et al.* Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* **12**, 334–342 (2016).
155. Herst, P. M., Howman, R. A., Neeson, P. J., Berridge, M. V. & Ritchie, D. S. The level of glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia blasts at diagnosis is prognostic for clinical outcome. *J Leukoc Biol* **89**, 51–55 (2011).
156. Dibble, C. C. & Cantley, L. C. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol* **25**, 545–555 (2015).
157. Lien, E. C., Lyssiotis, C. A. & Cantley, L. C. Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer. *Recent Results Cancer Res* **207**, 39–72 (2016).
158. Allegretti, M. *et al.* The pan-class I phosphatidyl-inositol-3 kinase inhibitor NVP-BKM120 demonstrates anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia. *Sci Rep* **5**, 18137 (2015).
159. Ju, H.-Q. *et al.* ITD mutation in FLT3 tyrosine kinase promotes Warburg effect and renders therapeutic sensitivity to glycolytic inhibition. *Leukemia* **31**, 2143–2150 (2017).
160. Xia, H.-G. *et al.* Degradation of HK2 by chaperone-mediated autophagy promotes metabolic catastrophe and cell death. *J Cell Biol* **210**, 705–716 (2015).
161. Chen, Y. *et al.* Inhibition of pentose phosphate pathway suppresses acute myelogenous leukemia. *Tumour Biol* **37**, 6027–6034 (2016).
162. Poulain, L. *et al.* High mTORC1 activity drives glycolysis addiction and sensitivity to G6PD inhibition in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **31**, 2326–2335 (2017).
163. Wang, Y.-H. *et al.* Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell* **158**, 1309–1323 (2014).
164. Büchner, T. *et al.* Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **24**, 2480–2489 (2006).
165. Büchner, T. *et al.* Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *J Clin Oncol* **27**, 61–69 (2009).
166. Elliott, S. S., Keim, N. L., Stern, J. S., Teff, K. & Havel, P. J. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* **76**, 911–922 (2002).
167. Chen, W.-L. *et al.* Enhanced Fructose Utilization Mediated by SLC2A5 Is a Unique Metabolic Feature of Acute Myeloid Leukemia with Therapeutic Potential. *Cancer Cell* **30**, 779–791 (2016).

168. Liang, R. J. *et al.* GLUT5 (SLC2A5) enables fructose-mediated proliferation independent of ketohexokinase. *Cancer Metab* **9**, 12 (2021).
169. Jeong, S. *et al.* High Fructose Drives the Serine Synthesis Pathway in Acute Myeloid Leukemic Cells. *Cell Metabolism* **33**, 145-159.e6 (2021).
170. Tsun, Z.-Y. & Possemato, R. Amino acid management in cancer. *Semin Cell Dev Biol* **43**, 22–32 (2015).
171. Muscaritoli, M. *et al.* Plasma amino acid concentrations in patients with acute myelogenous leukemia. *Nutrition* **15**, 195–199 (1999).
172. Hensley, C. T., Wasti, A. T. & DeBerardinis, R. J. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest* **123**, 3678–3684 (2013).
173. Anderson, N. M., Mucka, P., Kern, J. G. & Feng, H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell* **9**, 216–237 (2018).
174. Wang, Y. *et al.* Rapid diagnosis and prognosis of de novo acute myeloid leukemia by serum metabolomic analysis. *J Proteome Res* **12**, 4393–4401 (2013).
175. Matre, P. *et al.* Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget* **7**, 79722–79735 (2016).
176. Willems, L. *et al.* Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* **122**, 3521–3532 (2013).
177. Ni, F. *et al.* Critical role of ASCT2-mediated amino acid metabolism in promoting leukaemia development and progression. *Nat Metab* **1**, 390–403 (2019).
178. Gregory, M. A. *et al.* Glutaminase inhibition improves FLT3 inhibitor therapy for acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* **58**, 52–58 (2018).
179. Jacque, N. *et al.* Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood* **126**, 1346–1356 (2015).
180. Gallipoli, P. *et al.* Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3ITD acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood* **131**, 1639–1653 (2018).
181. Emadi, A. *et al.* Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. *Exp Hematol* **42**, 247–251 (2014).
182. Joshi, S. K. *et al.* The AML microenvironment catalyzes a stepwise evolution to gilteritinib resistance. *Cancer Cell* S1535-6108(21)00286-5 (2021) doi:10.1016/j.ccell.2021.06.003.
183. Gregory, M. A. *et al.* Targeting Glutamine Metabolism and Redox State for Leukemia Therapy. *Clin Cancer Res* **25**, 4079–4090 (2019).
184. Wellen, K. E. *et al.* The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev* **24**, 2784–2799 (2010).
185. Nicklin, P. *et al.* Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **136**, 521–534 (2009).

BIBLIOGRAPHIE

186. Miraki-Moud, F. *et al.* Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Blood* **125**, 4060–4068 (2015).
187. Mussai, F. *et al.* Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target. *Blood* **125**, 2386–2396 (2015).
188. Müller, H. J. & Boos, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* **28**, 97–113 (1998).
189. Dübbers, A. *et al.* Asparagine synthetase activity in paediatric acute leukaemias: AML-M5 subtype shows lowest activity. *Br J Haematol* **109**, 427–429 (2000).
190. Michelozzi, I. M. *et al.* Acute myeloid leukaemia niche regulates response to L-asparaginase. *Br J Haematol* **186**, 420–430 (2019).
191. Chen, T. *et al.* Antiproliferative effects of L-asparaginase in acute myeloid leukemia. *Exp Ther Med* **20**, 2070–2078 (2020).
192. Zhang, J. *et al.* Asparagine Plays a Critical Role in Regulating Cellular Adaptation to Glutamine Depletion. *Molecular Cell* **56**, 205–218 (2014).
193. Krall, A. S., Xu, S., Graeber, T. G., Braas, D. & Christofk, H. R. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nat Commun* **7**, 11457 (2016).
194. Hattori, A. *et al.* Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature* **545**, 500–504 (2017).
195. Raffel, S. *et al.* BCAT1 restricts α KG levels in AML stem cells leading to IDHmut-like DNA hypermethylation. *Nature* **551**, 384–388 (2017).
196. Bjelosevic, S. *et al.* Serine Biosynthesis Is a Metabolic Vulnerability in FLT3-ITD-Driven Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov* **11**, 1582–1599 (2021).
197. Ye, J. *et al.* Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6904–6909 (2012).
198. Chaneton, B. *et al.* Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* **491**, 458–462 (2012).
199. Ye, J. *et al.* Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia. *Cancer Discov* **4**, 1406–1417 (2014).
200. Pal, D. *et al.* Role of protein S-Glutathionylation in cancer progression and development of resistance to anti-cancer drugs. *Arch Biochem Biophys* **704**, 108890 (2021).
201. Lin, C.-H. *et al.* Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit as a therapeutic target in acute myeloid leukemia and solid tumors. *Am J Cancer Res* **11**, 2911–2927 (2021).
202. Zhao, X., Li, Y. & Wu, H. A novel scoring system for acute myeloid leukemia risk assessment based on the expression levels of six genes. *Int J Mol Med* **42**, 1495–1507 (2018).
203. Fujihara, K. M. *et al.* SLC7A11 is a superior determinant of APR-246 (Eprenetapopt) response than TP53 mutation status. 35.

204. Birsen, R. *et al.* APR-246 induces early cell death by ferroptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* (2021) doi:10.3324/haematol.2020.259531.
205. Barve, A. *et al.* Perturbation of Methionine/S-adenosylmethionine Metabolism as a Novel Vulnerability in MLL Rearranged Leukemia. *Cells* **8**, E1322 (2019).
206. Takei, H. *et al.* Usefulness of positron emission tomography for differentiating gliomas according to the 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *J Neurosurg* 1–10 (2019) doi:10.3171/2019.5.JNS19780.
207. Rots, M. G. *et al.* A possible role for methotrexate in the treatment of childhood acute myeloid leukaemia, in particular for acute monocytic leukaemia. *Eur J Cancer* **37**, 492–498 (2001).
208. Kanarek, N. *et al.* Histidine catabolism is a major determinant of methotrexate sensitivity. *Nature* **559**, 632–636 (2018).
209. Fallarino, F. *et al.* The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* **176**, 6752–6761 (2006).
210. Curti, A. *et al.* Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* **21**, 353–355 (2007).
211. El Kholly, N. M. *et al.* Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in acute myeloid leukemia and the effect of its inhibition on cultured leukemia blast cells. *Med Oncol* **28**, 270–278 (2011).
212. Folgiero, V. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **5**, 2052–2064 (2014).
213. Fukuno, K. *et al.* Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in leukemic cells indicates an unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Leukemia & Lymphoma* **56**, 1398–1405 (2015).
214. Hara, T. *et al.* Prognostic value of the combination of serum L-kynurenine level and indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA expression in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **57**, 2208–2211 (2016).
215. Curti, A. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T regulatory cells. *Blood* **109**, 2871–2877 (2007).
216. Mabuchi, R. *et al.* High serum concentration of L-kynurenine predicts unfavorable outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* **57**, 92–98 (2016).
217. van Galen, P. *et al.* Integrated Stress Response Activity Marks Stem Cells in Normal Hematopoiesis and Leukemia. *Cell Rep* **25**, 1109–1117.e5 (2018).
218. Farge, T. *et al.* Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov* **7**, 716–735 (2017).
219. Aroua, N. *et al.* Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov* **10**, 1544–1565 (2020).

BIBLIOGRAPHIE

220. Gottfried, E. L. Lipids of human leukocytes: relation to cell type. *Journal of Lipid Research* **8**, 321–327 (1967).
221. Usman, H. *et al.* Revisiting the dyslipidemia associated with acute leukemia. *Clin Chim Acta* **444**, 43–49 (2015).
222. Pabst, T. *et al.* The plasma lipidome in acute myeloid leukemia at diagnosis in relation to clinical disease features. *BBA Clin* **7**, 105–114 (2017).
223. Wu, Y. *et al.* Carnitine transporter CT2 (SLC22A16) is over-expressed in acute myeloid leukemia (AML) and target knockdown reduces growth and viability of AML cells. *Apoptosis* **20**, 1099–1108 (2015).
224. Shi, J. *et al.* High Expression of CPT1A Predicts Adverse Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia. *EBioMedicine* **14**, 55–64 (2016).
225. Mao, S. *et al.* Inhibition of CPT1a as a prognostic marker can synergistically enhance the antileukemic activity of ABT199. *J Transl Med* **19**, 181 (2021).
226. Mihaylova, M. M. & Shaw, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* **13**, 1016–1023 (2011).
227. Qu, Q., Zeng, F., Liu, X., Wang, Q. J. & Deng, F. Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death Dis* **7**, e2226–e2226 (2016).
228. Nakada, D., Saunders, T. L. & Morrison, S. J. Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* **468**, 653–658 (2010).
229. Samudio, I. *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest.* **120**, 142–156 (2010).
230. Tcheng, M. *et al.* Very long chain fatty acid metabolism is required in acute myeloid leukemia. *Blood* **137**, 3518–3532 (2021).
231. Tabe, Y. *et al.* Inhibition of FAO in AML co-cultured with BM adipocytes: mechanisms of survival and chemosensitization to cytarabine. *Sci Rep* **8**, 16837 (2018).
232. Ito, H., Nakamae, I., Kato, J.-Y. & Yoneda-Kato, N. Stabilization of fatty acid synthesis enzyme acetyl-CoA carboxylase 1 suppresses acute myeloid leukemia development. *J Clin Invest* **131**, 141529 (2021).
233. Pizer, E. S., Wood, F. D., Pasternack, G. R. & Kuhajda, F. P. Fatty acid synthase (FAS): a target for cytotoxic antimetabolites in HL60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res* **56**, 745–751 (1996).
234. Humbert, M. *et al.* Reducing FASN expression sensitizes acute myeloid leukemia cells to differentiation therapy. *Cell Death Differ* **28**, 2465–2481 (2021).
235. Yusuf, R. Z. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 3a2 protects AML cells from oxidative death and the synthetic lethality of ferroptosis inducers. *Blood* **136**, 1303–1316 (2020).
236. German, N. J. *et al.* PHD3 Loss in Cancer Enables Metabolic Reliance on Fatty Acid Oxidation via Deactivation of ACC2. *Mol Cell* **63**, 1006–1020 (2016).

237. Powell, J. A. *et al.* Targeting sphingosine kinase 1 induces MCL1-dependent cell death in acute myeloid leukemia. *Blood* **129**, 771–782 (2017).
238. Tan, S.-F. *et al.* Acid ceramidase is upregulated in AML and represents a novel therapeutic target. *Oncotarget* **7**, 83208–83222 (2016).
239. Bosc, C. *et al.* Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nature Communications* **11**, 4056 (2020).
240. Joffre, C., Ducau, C., Poillet-Perez, L., Courdy, C. & Mansat-De Mas, V. Autophagy a Close Relative of AML Biology. *Biology (Basel)* **10**, 552 (2021).
241. Salunkhe, S. *et al.* Metabolic rewiring in drug resistant cells exhibit higher OXPHOS and fatty acids as preferred major source to cellular energetics. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1861**, 148300 (2020).
242. Stuani, L. *et al.* Stable Isotope Labeling Highlights Enhanced Fatty Acid and Lipid Metabolism in Human Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci* **19**, E3325 (2018).
243. Reiter, K. *et al.* Tyrosine kinase inhibition increases the cell surface localization of FLT3-ITD and enhances FLT3-directed immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **32**, 313–322 (2018).
244. Lv, K. *et al.* Depalmitoylation Rewires FLT3-ITD Signaling and Exacerbates Leukemia Progression. *Blood* blood.2021011582 (2021) doi:10.1182/blood.2021011582.
245. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
246. Koppula, P., Zhuang, L. & Gan, B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell* **12**, 599–620 (2021).
247. Liu, X. *et al.* Cystine transporter regulation of pentose phosphate pathway dependency and disulfide stress exposes a targetable metabolic vulnerability in cancer. *Nat Cell Biol* **22**, 476–486 (2020).
248. Sriskanthadevan, S. *et al.* AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood* **125**, 2120–2130 (2015).
249. Kang, M.-G. *et al.* Clinicopathological Implications of Mitochondrial Genome Alterations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Ann Lab Med* **36**, 101–110 (2016).
250. Škrtić, M. *et al.* Inhibition of Mitochondrial Translation as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **20**, 674–688 (2011).
251. Liyanage, S. U. *et al.* Leveraging increased cytoplasmic nucleoside kinase activity to target mtDNA and oxidative phosphorylation in AML. *Blood* **129**, 2657–2666 (2017).
252. He, L. *et al.* Somatic mitochondrial DNA mutations in adult-onset leukaemia. *Leukemia* **17**, 2487–2491 (2003).
253. Silkjaer, T. *et al.* Characterization and prognostic significance of mitochondrial DNA variations in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* **90**, 385–396 (2013).

BIBLIOGRAPHIE

254. Wu, S., Akhtari, M. & Alachkar, H. Characterization of Mutations in the Mitochondrial Encoded Electron Transport Chain Complexes in Acute Myeloid Leukemia. *Sci Rep* **8**, 13301 (2018).
255. Ishikawa, K. *et al.* ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. *Science* **320**, 661–664 (2008).
256. Petros, J. A. *et al.* mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *PNAS* **102**, 719–724 (2005).
257. Roth, K. G., Mambetsariev, I., Kulkarni, P. & Salgia, R. The Mitochondrion as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. *Trends Mol Med* **26**, 119–134 (2020).
258. Cole, A. *et al.* Inhibition of the Mitochondrial Protease ClpP as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **27**, 864–876 (2015).
259. Nii, T. *et al.* Imipridone ONC212 activates orphan G protein-coupled receptor GPR132 and integrated stress response in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **33**, 2805–2816 (2019).
260. Katajisto, P. *et al.* Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* **348**, 340–343 (2015).
261. Pei, S. *et al.* AMPK/FIS1-Mediated Mitophagy Is Required for Self-Renewal of Human AML Stem Cells. *Cell Stem Cell* **23**, 86-100.e6 (2018).
262. Li, Y. *et al.* A mitophagy inhibitor targeting p62 attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Letters* **510**, 24–36 (2021).
263. Tian, Y. *et al.* Identification of Novel Molecular Markers for Prognosis Estimation of Acute Myeloid Leukemia: Over-Expression of PDCD7, FIS1 and Ang2 May Indicate Poor Prognosis in Pretreatment Patients with Acute Myeloid Leukemia. *PLOS ONE* **9**, e84150 (2014).
264. Molina, J. R. *et al.* An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med* **24**, 1036–1046 (2018).
265. Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. & Eppenberger, H. M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal* **281**, 21–40 (1992).
266. Kazak, L. & Cohen, P. Creatine metabolism: energy homeostasis, immunity and cancer biology. *Nat Rev Endocrinol* **16**, 421–436 (2020).
267. Fenouille, N. *et al.* The creatine kinase pathway is a metabolic vulnerability in EVI1-positive acute myeloid leukemia. *Nat Med* **23**, 301–313 (2017).
268. Madak, J. T., Bankhead, A., Cuthbertson, C. R., Showalter, H. D. & Neamati, N. Revisiting the role of dihydroorotate dehydrogenase as a therapeutic target for cancer. *Pharmacol Ther* **195**, 111–131 (2019).
269. Cao, L. *et al.* Targeting of Hematologic Malignancies with PTC299, A Novel Potent Inhibitor of Dihydroorotate Dehydrogenase with Favorable Pharmaceutical Properties. *Mol Cancer Ther* **18**, 3–16 (2019).

270. Sykes, D. B. *et al.* Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Cell* **167**, 171-186.e15 (2016).
271. Sullivan, L. B. *et al.* Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* **162**, 552–563 (2015).
272. Morscher, R. J. *et al.* Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation. *Nature* **554**, 128–132 (2018).
273. Zhao, L. N., Björklund, M., Caldez, M. J., Zheng, J. & Kaldis, P. Therapeutic targeting of the mitochondrial one-carbon pathway: perspectives, pitfalls, and potential. *Oncogene* **40**, 2339–2354 (2021).
274. Martin-Cabrera, P. *et al.* Acute myeloid leukemias with ring sideroblasts show a unique molecular signature straddling secondary acute myeloid leukemia and de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* **102**, e125–e128 (2017).
275. Saito, K. *et al.* Generation and Molecular Characterization of Human Ring Sideroblasts: a Key Role of Ferrous Iron in Terminal Erythroid Differentiation and Ring Sideroblast Formation. *Mol Cell Biol* **39**, e00387-18 (2019).
276. Berger, G. *et al.* Ring sideroblasts in AML are associated with adverse risk characteristics and have a distinct gene expression pattern. *Blood Adv* **3**, 3111–3122 (2019).
277. Bertoli, S. *et al.* Ferritin heavy/light chain (FTH1/FTL) expression, serum ferritin levels, and their functional as well as prognostic roles in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* **102**, 131–142 (2019).
278. Yang, Y., Tang, Z., An, T. & Zhao, L. The impact of iron chelation therapy on patients with lower/intermediate IPSS MDS and the prognostic role of elevated serum ferritin in patients with MDS and AML: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **98**, e17406 (2019).
279. Calabrese, C. *et al.* Deferasirox-Dependent Iron Chelation Enhances Mitochondrial Dysfunction and Restores p53 Signaling by Stabilization of p53 Family Members in Leukemic Cells. *Int J Mol Sci* **21**, E7674 (2020).
280. Argenziano, M. *et al.* Eltrombopag and its iron chelating properties in pediatric acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **12**, 1377–1387 (2021).
281. Lin, K. H. *et al.* Systematic Dissection of the Metabolic-Apoptotic Interface in AML Reveals Heme Biosynthesis to Be a Regulator of Drug Sensitivity. *Cell Metab* **29**, 1217-1231.e7 (2019).
282. Brand, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **100**, 14–31 (2016).
283. Mailloux, R. J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biology* **4**, 381–398 (2015).
284. Trombetti, S. *et al.* Oxidative Stress and ROS-Mediated Signaling in Leukemia: Novel Promising Perspectives to Eradicate Chemoresistant Cells in Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci* **22**, 2470 (2021).

BIBLIOGRAPHIE

285. Prieto-Bermejo, R., Romo-González, M., Pérez-Fernández, A., Ijurko, C. & Hernández-Hernández, Á. Reactive oxygen species in haematopoiesis: leukaemic cells take a walk on the wild side. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **37**, 125 (2018).
286. Samimi, A., Kalantari, H., Lorestani, M. Z., Shirzad, R. & Saki, N. Oxidative stress in normal hematopoietic stem cells and leukemia. *APMIS* **126**, 284–294 (2018).
287. Lagadinou, E. D. *et al.* BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell* **12**, 329–341 (2013).
288. Hole, P. S. *et al.* Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. *Blood* **122**, 3322–3330 (2013).
289. Kaweme, N. M., Zhou, S., Changwe, G. J. & Zhou, F. The significant role of redox system in myeloid leukemia: from pathogenesis to therapeutic applications. *Biomark Res* **8**, 63 (2020).
290. Nguyen, L. X. T. *et al.* The Bcl-2 inhibitor venetoclax inhibits Nrf2 antioxidant pathway activation induced by hypomethylating agents in AML. *J Cell Physiol* **234**, 14040–14049 (2019).
291. Nair, R., Salinas-Illarena, A. & Baldauf, H.-M. New strategies to treat AML: novel insights into AML survival pathways and combination therapies. *Leukemia* **35**, 299–311 (2021).
292. Pollyea, D. A. *et al.* Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med* **24**, 1859–1866 (2018).
293. Swaminathan, M. & Wang, E. S. Novel therapies for AML: a round-up for clinicians. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **13**, 1389–1400 (2020).
294. Voso, M. T. *et al.* MRD in AML: The Role of New Techniques. *Front Oncol* **9**, 655 (2019).
295. Katzir, R. *et al.* The landscape of tiered regulation of breast cancer cell metabolism. *Sci Rep* **9**, 17760 (2019).
296. Baccin, C. *et al.* Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nature Cell Biology* **22**, 38–48 (2020).
297. Ben-Ishay, Z., Prindull, G., Borenstein, A. & Sharon, S. Bone marrow stromal deficiency in acute myeloid leukemia in mice. *Leuk Res* **8**, 1057–1064 (1984).
298. Mortensen, B. T. *et al.* Changing bone marrow micro-environment during development of acute myeloid leukaemia in rats. *Br J Haematol* **102**, 458–464 (1998).
299. Griffin, J. D. *et al.* Secretion of interleukin-1 by acute myeloblastic leukemia cells in vitro induces endothelial cells to secrete colony stimulating factors. *Blood* **70**, 1218–1221 (1987).
300. Carter, B. Z. *et al.* An ARC-Regulated IL1 β /Cox-2/PGE2/ β -Catenin/ARC Circuit Controls Leukemia-Microenvironment Interactions and Confers Drug Resistance in AML. *Cancer Res* **79**, 1165–1177 (2019).
301. Chen, T. *et al.* Leukemia-derived exosomes induced IL-8 production in bone marrow stromal cells to protect the leukemia cells against chemotherapy. *Life Sciences* **221**, 187–195 (2019).

302. Kumar, B. *et al.* Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia* **32**, 575–587 (2018).
303. Hong, C.-S., Muller, L., Whiteside, T. L. & Boyiadzis, M. Plasma Exosomes as Markers of Therapeutic Response in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Immunology* **5**, 160 (2014).
304. Hong, C.-S., Jeong, E., Boyiadzis, M. & Whiteside, T. L. Increased small extracellular vesicle secretion after chemotherapy via upregulation of cholesterol metabolism in acute myeloid leukaemia. *J Extracell Vesicles* **9**, 1800979 (2020).
305. Advani, A. S. *et al.* SWOG0919: a Phase 2 study of idarubicin and cytarabine in combination with pravastatin for relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **167**, 233–237 (2014).
306. Kornblau, S. M. *et al.* Blockade of adaptive defensive changes in cholesterol uptake and synthesis in AML by the addition of pravastatin to idarubicin + high-dose Ara-C: a phase 1 study. *Blood* **109**, 2999–3006 (2007).
307. Lishner, M., Bar-Sef, A., Elis, A. & Fabian, I. Effect of Simvastatin Alone and in Combination With Cytosine Arabinoside on the Proliferation of Myeloid Leukemia Cell Lines. *Journal of Investigative Medicine* **49**, 319–324 (2001).
308. Lee, J. S. *et al.* Statins enhance efficacy of venetoclax in blood cancers. *Sci Transl Med* **10**, eaaq1240 (2018).
309. Sendker, S., Reinhardt, D. & Niktoreh, N. Redirecting the Immune Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)* **13**, 1423 (2021).
310. de Andrade Mello, P., Coutinho-Silva, R. & Savio, L. E. B. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol* **8**, 1526 (2017).
311. Salvestrini, V. *et al.* Purinergic signaling inhibits human acute myeloblastic leukemia cell proliferation, migration, and engraftment in immunodeficient mice. *Blood* **119**, 217–226 (2012).
312. Dulphy, N. *et al.* Contribution of CD39 to the immunosuppressive microenvironment of acute myeloid leukaemia at diagnosis. *Br J Haematol* **165**, 722–725 (2014).
313. Schick, J. *et al.* Antileukemic T-cell Responses Can Be Predicted by the Composition of Specific Regulatory T-cell Subpopulations. *Journal of Immunotherapy* **36**, 223–237 (2013).
314. Luna-Yolba, R. *et al.* Disrupting Mitochondrial Electron Transfer Chain Complex I Decreases Immune Checkpoints in Murine and Human Acute Myeloid Leukemic Cells. *Cancers (Basel)* **13**, 3499 (2021).
315. Lecciso, M. *et al.* ATP Release from Chemotherapy-Treated Dying Leukemia Cells Elicits an Immune Suppressive Effect by Increasing Regulatory T Cells and Tolerogenic Dendritic Cells. *Front Immunol* **8**, 1918 (2017).
316. Hardaway, A. L., Herroon, M. K., Rajagurubandara, E. & Podgorski, I. Bone marrow fat: linking adipocyte-induced inflammation with skeletal metastases. *Cancer Metastasis Rev* **33**, 527–543 (2014).

BIBLIOGRAPHIE

317. Shafat, M. S. *et al.* Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood* **129**, 1320–1332 (2017).
318. Ehsanipour, E. A. *et al.* Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res* **73**, 2998–3006 (2013).
319. Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J. R., Pui, C.-H. & Campana, D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest* **117**, 1049–1057 (2007).
320. van Gastel, N. *et al.* Induction of a Timed Metabolic Collapse to Overcome Cancer Chemoresistance. *Cell Metabolism* **32**, 391-403.e6 (2020).
321. Moschoi, R. *et al.* Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. **128**, 12 (2016).
322. Saito, K. *et al.* Exogenous mitochondrial transfer and endogenous mitochondrial fission facilitate AML resistance to OxPhos inhibition. *Blood Adv* bloodadvances.2020003661 (2021) doi:10.1182/bloodadvances.2020003661.
323. Su, M., Chang, Y.-T., Hernandez, D., Jones, R. J. & Ghiaur, G. Regulation of drug metabolizing enzymes in the leukaemic bone marrow microenvironment. *J Cell Mol Med* **23**, 4111–4117 (2019).
324. Ganzel, C. *et al.* Extramedullary Disease in Adult Acute Myeloid Leukemia Is Common but Lacks Independent Significance: Analysis of Patients in ECOG-ACRIN Cancer Research Group Trials, 1980-2008. *J Clin Oncol* **34**, 3544–3553 (2016).
325. Jost, F. *et al.* Model-Based Optimal AML Consolidation Treatment. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **67**, 3296–3306 (2020).
326. Stiehl, T., Baran, N., Ho, A. D. & Marciniak-Czochra, A. Clonal selection and therapy resistance in acute leukaemias: mathematical modelling explains different proliferation patterns at diagnosis and relapse. *J R Soc Interface* **11**, 20140079 (2014).
327. Banck, J. C. & Görlich, D. In-silico comparison of two induction regimens (7 + 3 vs 7 + 3 plus additional bone marrow evaluation) in acute myeloid leukemia treatment. *BMC Syst Biol* **13**, 1–14 (2019).
328. Lim, W.-S. *et al.* Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in bone marrow xenografts. *Leuk Res* **34**, 1214–1223 (2010).
329. Saland, E. *et al.* A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* **5**, e297 (2015).
330. Agliano, A. *et al.* Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2R γ null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *International Journal of Cancer* **123**, 2222–2227 (2008).
331. Corral, J. *et al.* An Mll–AF9 Fusion Gene Made by Homologous Recombination Causes Acute Leukemia in Chimeric Mice: A Method to Create Fusion Oncogenes. *Cell* **85**, 853–861 (1996).

332. Solh, M., Solomon, S., Morris, L., Holland, K. & Bashey, A. Extramedullary acute myelogenous leukemia. *Blood Reviews* **30**, 333–339 (2016).
333. Shallis, R. M. *et al.* Myeloid sarcoma, chloroma, or extramedullary acute myeloid leukemia tumor: A tale of misnomers, controversy and the unresolved. *Blood Reviews* **47**, 100773 (2021).
334. Lindemalm, S., Liliemark, J., Larsson, B. S. & Albertioni, F. Distribution of 2-chloro-2'-deoxyadenosine, 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine, fludarabine and cytarabine in mice: a whole-body autoradiography study. *Med Oncol* **16**, 239–244 (1999).
335. Chen, W.-L. *et al.* A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. *Blood* **124**, 1645–1654 (2014).
336. Musharraf, S. G., Siddiqui, A. J., Shamsi, T. & Naz, A. SERUM metabolomics of acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia for probing biomarker molecules. *Hematol Oncol* **9** (2016).
337. Song, B. H. *et al.* Profiling of Metabolic Differences between Hematopoietic Stem Cells and Acute/Chronic Myeloid Leukemia. *Metabolites* **10**, E427 (2020).
338. Ye, H. *et al.* Subversion of Systemic Glucose Metabolism as a Mechanism to Support the Growth of Leukemia Cells. *Cancer Cell* **34**, 659-673.e6 (2018).
339. Ye, H. *et al.* Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell* **19**, 23–37 (2016).
340. Ye, H. *et al.* The Hepatic Microenvironment Uniquely Protects Leukemia Cells through Induction of Growth and Survival Pathways Mediated by LIPG. *Cancer Discov* **11**, 500–519 (2021).
341. Luciano, R. L. & Brewster, U. C. Kidney involvement in leukemia and lymphoma. *Adv Chronic Kidney Dis* **21**, 27–35 (2014).
342. Choi, M. H. *et al.* Acute pulmonary complications in patients with hematologic malignancies. *Radiographics* **34**, 1755–1768 (2014).
343. Dupuy, F. *et al.* PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab* **22**, 577–589 (2015).
344. Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. & Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 28 (2020).
345. Welch, D. R. & Hurst, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res* **79**, 3011–3027 (2019).
346. Paydas, S., Zorludemir, S. & Ergin, M. Granulocytic sarcoma: 32 cases and review of the literature. *Leukemia & Lymphoma* **47**, 2527–2541 (2006).
347. Byrd, J. C. *et al.* Extramedullary leukemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21)(q22;q22): results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *JCO* **15**, 466–475 (1997).
348. Baer, M. R., Barcos, M., Farrell, H., Raza, A. & Preisler, H. D. Acute myelogenous leukemia with leukemia cutis. Eighteen cases seen between 1969 and 1986. *Cancer* **63**, 2192–2200 (1989).

BIBLIOGRAPHIE

349. Su, W. P. Clinical, histopathologic, and immunohistochemical correlations in leukemia cutis. *Semin Dermatol* **13**, 223–230 (1994).
350. Yao, T. & Asayama, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol* **16**, 99–117 (2017).
351. Lagziel, S., Gottlieb, E. & Shlomi, T. Mind your media. *Nature Metabolism* **2**, 1369–1372 (2020).
352. Cantor, J. R. *et al.* Physiologic medium rewires cellular metabolism and reveals uric acid as an endogenous inhibitor of UMP synthase. 40 (2018).
353. Vande Voorde, J. *et al.* Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Sci Adv* **5**, eaau7314 (2019).
354. Layssol-Lamour, C. J., Sarry, J.-E., Braun, J.-P. D., Trumel, C. & Bourgès-Abella, N. H. Reference Values for Hematology, Plasma Biochemistry, Bone Marrow Cytology and Bone Histology of NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ Immunodeficient Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* (2020) doi:10.30802/AALAS-JAALAS-20-000020.
355. Dyar, K. A. *et al.* Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks. *Cell* **174**, 1571-1585.e11 (2018).
356. Malik, D. M., Paschos, G. K., Sehgal, A. & Weljie, A. M. Circadian and Sleep Metabolomics Across Species. *J Mol Biol* **432**, 3578–3610 (2020).
357. Ye, H. *et al.* The Hepatic Microenvironment Uniquely Protects Leukemia Cells through Induction of Growth and Survival Pathways Mediated by LIPG. *Cancer Discov* **11**, 500–519 (2021).
358. Ye, H. *et al.* Leukemic stem cells evade chemotherapy by metabolic adaptation to an adipose tissue niche. 27 (2017).
359. Sullivan, M. R. *et al.* Quantification of microenvironmental metabolites in murine cancers reveals determinants of tumor nutrient availability. *Elife* **8**, e44235 (2019).
360. Sullivan, M. R., Lewis, C. A. & Muir, A. Isolation and Quantification of Metabolite Levels in Murine Tumor Interstitial Fluid by LC/MS. *Bio Protoc* **9**, e3427 (2019).
361. Gromov, P. *et al.* Tumor interstitial fluid — A treasure trove of cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1834**, 2259–2270 (2013).
362. Terkelsen, T. *et al.* High-throughput proteomics of breast cancer interstitial fluid: identification of tumor subtype-specific serologically relevant biomarkers. *Mol Oncol* **15**, 429–461 (2021).
363. Binek, A. *et al.* Flow Cytometry Has a Significant Impact on the Cellular Metabolome. *J Proteome Res* **18**, 169–181 (2019).
364. DeVilbiss, A. W. *et al.* Metabolomic profiling of rare cell populations isolated by flow cytometry from tissues. *Elife* **10**, e61980 (2021).
365. Lau, A. N. *et al.* Dissecting cell-type-specific metabolism in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Elife* **9**, e56782 (2020).

366. Llufrío, E. M., Wang, L., Naser, F. J. & Patti, G. J. Sorting cells alters their redox state and cellular metabolome. *Redox Biol* **16**, 381–387 (2018).
367. Ferguson, C. N., Fowler, J. W. M., Waxer, J. F., Gatti, R. A. & Loo, J. A. Mass Spectrometry-Based Tissue Imaging of Small Molecules. *Adv Exp Med Biol* **1140**, 99–109 (2019).
368. Buchberger, A. R., DeLaney, K., Johnson, J. & Li, L. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Anal Chem* **90**, 240–265 (2018).
369. Duncan, K. D., Fyrestam, J. & Lanekoff, I. Advances in mass spectrometry based single-cell metabolomics. *Analyst* **144**, 782–793 (2019).
370. Wu, J. *et al.* A single-cell survey of cellular hierarchy in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* **13**, 128 (2020).
371. Baryawno, N. *et al.* A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* **177**, 1915–1932.e16 (2019).
372. Ippolito, L., Morandi, A., Giannoni, E. & Chiarugi, P. Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape. *Trends in Biochemical Sciences* **44**, 153–166 (2019).
373. Xie, J. *et al.* Single-Cell Atlas Reveals Fatty Acid Metabolites Regulate the Functional Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* **9**, 653308 (2021).
374. Kumar, R., Ghosh, M., Kumar, S. & Prasad, M. Single Cell Metabolomics: A Future Tool to Unmask Cellular Heterogeneity and Virus-Host Interaction in Context of Emerging Viral Diseases. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).
375. Yao, Y., Li, F., Huang, J., Jin, J. & Wang, H. Leukemia stem cell-bone marrow microenvironment interplay in acute myeloid leukemia development. *Experimental Hematology & Oncology* **10**, 39 (2021).
376. Wang, Q. *et al.* Pharmacokinetics, drug metabolism, and tissue distribution of CPX-351 in animals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **30**, 102275 (2020).
377. Farge, T. Atteintes médullaires et extramédullaires des leucémies aiguës myéloïdes : rôle de CD36. (Université Paul Sabatier de Toulouse, 2021).
378. TeSlaa, T. *et al.* The Source of Glycolytic Intermediates in Mammalian Tissues. *Cell Metabolism* **33**, 367–378.e5 (2021).
379. Jang, C. *et al.* Metabolite Exchange between Mammalian Organs Quantified in Pigs. *Cell Metab* **30**, 594–606.e3 (2019).
380. Faubert, B., Tasdogan, A., Morrison, S. J., Mathews, T. P. & DeBerardinis, R. J. Stable isotope tracing to assess tumor metabolism in vivo. *Nat Protoc* 1–23 (2021) doi:10.1038/s41596-021-00605-2.
381. Jacobs, S. *et al.* Detection of chemotherapy-resistant patient-derived acute lymphoblastic leukemia clones in murine xenografts using cellular barcodes. *Exp Hematol* **91**, 46–54 (2020).

Annexes

Annexes

Annexe I - Protocole de prélèvement des tissus murins pour la métabolomique

Matériel nécessaire

- Matériel de dissection (scalpels, ciseaux de précision, ...)
- Pour le prélèvement sanguin :
 - Poste d'anesthésie
 - Pipettes pasteur
 - Tubes EDTA
- Pour l'analyse FACS (Si prise en greffe analysée) :
 - Plaques 6 puits
 - Seringues 5mL
 - Filtres
 - HBSS + 1% FVS
- Centrifuge de paillasse : modèle 5424R, centrifuge réfrigérée à eppendorf
- Tubes eppendorfs

Protocole

1. Prélèvement sanguin (*Expérimentateur 1*)

Le prélèvement sanguin doit être fait avant sacrifice de la souris, afin de préserver l'échantillon. Le prélèvement, rétro-orbitaire ou mandibulaire, doit être fait sous anesthésie et le plus rapidement possible. L'échantillon sanguin est ensuite conservé à 4°C jusqu'à isolation du plasma.

2. Prélèvement des organes (*Expérimentateurs 1 & 2*)

Après sacrifice de la souris (*Expérimentateur 1*), les organes sont prélevés dans cet ordre, sans utiliser d'éthanol, qui contaminera l'échantillon (*Expérimentateur 2*) :

- Tissus adipeux sous-cutanés
- Muscle
- Fémurs et tibias
- Rate
- Pancréas
- Rein
- Foie
- Poumon
- Cœur

Si la liste d'organes à prélever est amenée à changer, bien spécifier et respecter l'ordre de prélèvement des organes, de façon à être le plus répétable entre les expériences.

ANNEXES

3. Pesée et congélation des organes (*Expérimentateur 3 & 4*)

A l'exception des fémurs et tibias, qui nécessitent une étape d'isolation de la moelle osseuse, les organes sont pesés, référencés et congelés dans l'azote liquide. Pour la moelle osseuse, les épiphyses sont coupées des deux côtés des os, puis positionnés dans un tube eppendorf préalablement taré. Les échantillons sont alors centrifugés à 10 000 rpm pendant 30 secondes, à 4°C. La moelle osseuse (de couleur rouge ou blanche, selon la présence de blastes ou non) est concentrée au fond du tube. Les os sont alors enlevés du tube, qui est pesé et congelé dans l'azote liquide.

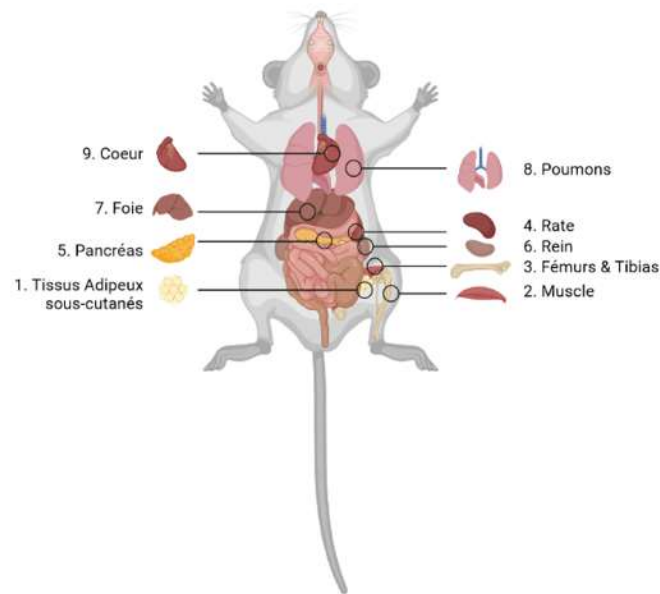


Figure 34. Schéma de dissection des souris

4. Isolation du plasma

Les tubes de sang sont centrifugés à 3 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le plasma est alors collecté, aliquoté, référencé et conservé à -80°C jusqu'à extraction.

5. Facultatif – Préparation d'échantillons pour analyse de la prise en greffe par FACS (*Expérimentateurs 3 & 4*)

Avant début de la manipulation, préparer les plaques 6 puits : Dans chaque puit, un filtre est positionné avec 2mL d'HBSS + 1%FVS. Il faut compter 2 puits par souris si l'analyse est faite sur moelle osseuse et rate. Sinon, il faut compter un puit par organe.

Lorsque les souris sont xéno greffées, il faut à minima conserver un échantillon de rate et de moelle osseuse pour mesurer la prise en greffe des souris.

La rate est pesée, coupée en deux, puis séparée en deux échantillons qui seront eux-mêmes pesés. Le premier échantillon sera congelé pour l'analyse métabolomique. Le second est placé dans la plaque 6 puits, pour être disloqué et conservés pour analyse FACS.

Pour la moelle osseuse, un tibia et un fémur sont préparés comme précédemment pour l'analyse métabolomique. Les seconds sont broyés, filtrés dans la plaque 6 puits et conservés pour analyse FACS.

Annexe II - Protocoles de prélèvement des tissus murins pour la métabolomique

Matériel nécessaire

- Lyseur de tissus, avec tubes et billes de broyage adaptés
- Centrifuge de paillasse : modèle 5424R, centrifuge réfrigérée à eppendorf
- Tubes eppendorfs
- Speed-Vac
- Vials d'injection
- Inserts
- Méthanol (MeOH)
- Acétonitrile (ACN)
- Eau milliQ (H₂O mQ)
- IDMS

Protocoles

1. Extraction des plasmas

- Décongeler des volumes de 10 à 50µL de plasma (/!\ **Conserver tout au long de l'extraction l'échantillon à 4°C**)
 - Ajouter de l'eau mQ pour QSP 100µL d'échantillon
 - Ajouter 400µL de MeOH froid (-20°C)
 - Vortexer pendant 5s pour homogénéiser l'échantillon
 - Incuber à -20°C pendant 15min
 - Centrifuger les échantillons à 2000g pendant 5min à 4°C
 - Récupérer le surnageant (Privilégier un volume plus petit pour ne pas contaminer le surnageant avec le culot) et noter le volume prélevé
 - Ajouter 125µL d'extrait dans un tube de séchage (conserver le reste (ca. 375µL) dans un autre tube)
 - Ajouter 35µL d'IDMS
 - Sécher O/N les échantillons dans le Speed-Vac
 - Conserver à -80°C les échantillons secs jusqu'à analyse
-
- Le jour de l'analyse : Resuspendre dans 60µL d'H₂O mQ et séparer en deux échantillons de 30µL, ajoutés dans les vials d'injection

ANNEXES

2. Extraction des tissus

- Transvaser les tissus dans des tubes de broyage contenant les billes de broyage adaptées
- Broyage à froid (plonger les supports dans l'azote liquide si possible, sinon dans la carboglace) : 3 cycles de 1 min à 25Hz (refroidir les tubes dans la carboglace entre les cycles)
- Conserver à -80°C jusqu'à la prochaine étape

- Préparer un volume adéquat (en fonction du nombre d'échantillons) de solvant : ACN/MeOH/H₂O mQ (2 :2 :1) + 0.1% Acide formique. Conserver à 20°C jusqu'à utilisation
- Peser à peu près exactement entre 5 et 10mg de tissu homogénéisé (être le plus rapide possible pour ne pas décongeler le tissu)
- #Ajouter 750µL de solvant d'extraction (MeOH/ACN/H₂O)
- Broyage à froid : 2 cycles de 1min à 25Hz (refroidir les tubes dans la carboglace entre les cycles)
- Centrifuger à 2000g pendant 5min à 4°C
- Prélever le surnageant (Privilégier un volume plus petit pour ne pas contaminer le surnageant avec le culot) et noter le volume prélevé#
- Répéter les étapes entre # # une seconde fois. Noter le volume total de surnageant prélevé
- Ajouter 1mL d'extrait dans un tube de séchage (CM) et 75µL dans un second (AA) (conserver le reste (ca. 425µL) dans un autre tube)
- Ajouter 35µL d'IDMS dans le tube CM et 25µL d'IDMS dans le tube AA
- Sécher O/N les échantillons dans le Speed-Vac
- Conserver à -80°C les échantillons secs jusqu'à analyse
- Sécher O/N les échantillons dans le Speed-Vac
- Conserver à -80°C les échantillons secs jusqu'à analyse

- Le jour de l'analyse : Resuspendre dans 50µL d'H₂O mQ dans les vials d'injection chaque échantillon. Bien différencier les échantillons pour la méthode AA et CM